

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 975 182**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/205 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/20 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/145 (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2018** **PCT/CN2018/077905**
87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2018** **WO18161858**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2018** **E 18764419 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2024** **EP 3420076**

54 Título: **Métodos de producción y caracterización de vacunas víricas y composición de vacuna vírica**

30 Prioridad:

06.03.2017 CN 201710139497
06.03.2017 CN 201710139533
25.04.2017 CN 201710298490
25.04.2017 CN 201710298557

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2024

73 Titular/es:

**GUANGZHOU REALBENEFITSPOT
PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
Room 101, Building 3 and Room 101, Building 4
No. 9 Yayingshi Road Huangpu District
Guangzhou City, CN**

72 Inventor/es:

**LIU, SALA DIANLIAN;
AI, WEN y
SHEN, SALA MINGFENG**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 975 182 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de producción y caracterización de vacunas víricas y composición de vacuna vírica

5 **Solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad sobre las Solicitudes Chinas CN201710298490.1, CN2017101395331, CN201710139497.7, CN201710139533.1.

10 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a métodos de aislamiento de partículas de virus y de producción de una composición de vacuna contra virus. La divulgación también se refiere a composiciones de vacuna contra el virus de la rabia y a métodos de evaluación de la idoneidad de una composición de vacuna vírica para su uso clínico.

15 **Antecedentes de la invención**

Los virus se pueden dividir en virus con envoltura (por ejemplo, el virus de la rabia) y virus sin envoltura. Los virus sin envoltura sólo consisten en la proteína de la cápside y los ácidos nucleicos genómicos víricos. Generalmente tienen una estructura homogénea y son fáciles de separar y purificar. Los virus con envoltura, por el contrario, tienen una estructura complicada y heterogeneidad.

Los virus con envoltura generalmente tienen un ADN o ARN lineal en el núcleo interno de las partículas víricas. El núcleo interno está rodeado por una cápside, que se compone de múltiples subunidades de nucleoproteínas. Juntos, el núcleo interno y la cápside forman una partícula de nucleocápside muy compacta. La partícula de nucleocápside está envuelta por una envoltura lipídica en la que se ubica una o más de una proteína de membrana externa. Cada proteína de membrana externa tiene múltiples copias en la superficie y está densamente distribuida en la superficie del virus. La una o más proteínas de membrana externa generalmente están glicosiladas hasta cierto punto.

Los métodos actuales de purificación de virus con envoltura (por ejemplo, el virus de la rabia) se basan principalmente en los diferentes tamaños moleculares entre la partícula de virus y las impurezas, por ejemplo, mediante el uso de ultracentrifugación en gradiente de densidad y/o cromatografía de filtración en gel. Sin embargo, las impurezas que tienen un tamaño similar al de las partículas víricas no pueden separarse mediante estos métodos. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos métodos de purificación de virus con envoltura (por ejemplo, el virus de la rabia).

El documento WO 2012/061815 A2 describe partículas similares a virus (VLP, por sus siglas en inglés) de la glicoproteína de la rabia.

El documento WO 2011/011390 A1 describe proteínas HA del virus de la gripe recombinantes purificadas. El documento WO 2006/136566 A1 describe un proceso para la purificación preparativa de partículas similares a virus.

El documento US 2014/0004145 A1 describe la purificación de partículas similares a virus. Kang, H. *et al.*, *Viruses*, vol. 7, N.º 3 (2015) detalla que las partículas quiméricas similares al virus de la rabia que contienen GM-CSF anclado a la membrana potencian la respuesta inmunitaria contra el virus de la rabia. Dietzschold, B. *Current laboratory techniques in rabies diagnosis, research and prevention*, volumen 2, 47-56 (2015) describe la purificación del virus de la rabia y sus subunidades. Kurosawa *et al.*, *World Journal of Vaccines* (2012), 2, 155-160 describe la purificación de partículas del virus del dengue mediante cromatografía en hidroxipatita cerámica en una sola etapa. Gagnon, P. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, 1 - 20 (2009) describe la purificación cromatográfica de partículas de virus.

El documento US 2010/260798 A1 describe un método para purificar el virus de la rabia. Michen, B. y Graule, T. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 109, N.º 2, 388-397 (2010) describen puntos isoeléctricos de virus. El documento US 2009/247735 A1 describe la capacidad potenciada y la purificación de proteínas mediante cromatografía en modo mixto en presencia de polímeros orgánicos no iónicos solubles en agua.

Sokol, F. *et al.*, *Journal of Virology*, vol. 2, N.º 8, 836-849 (1968) describe la purificación del virus de la rabia cultivado en cultivo tisular. El documento EP 0 171 771 A2 describe un método para la purificación del virus de la rabia. Kuiper, M. *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 80, N.º 4, 445-453 (2002) describe la purificación de un vector de terapia génica funcional derivado del virus de la leucemia murina de Moloney usando filtración de membrana y cromatografía en hidroxipatita cerámica. Pato, T. P. *et al.*, *Vaccine*, vol. 32, N.º 24, 2789-2793 (2014) describe el desarrollo de una etapa de captura basada en un adsorbedor de membrana para la purificación del virus de la fiebre amarilla.

El documento US 2009/247735 A1 describe la capacidad potenciada y la purificación de proteínas mediante cromatografía en modo mixto en presencia de polímeros orgánicos no iónicos solubles en agua.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método de purificación de un virus de la rabia a partir de una muestra biológica, que comprende

- a) someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio aniónico ("IA")
- b) seguida de una cromatografía en hidroxipatita ("HA"),

en donde todas las etapas de cromatografía de IA y en HA tienen lugar a un pH de entre 7,5 y 7,7, preferentemente

7,6,

y en donde el virus purificado resultante está esencialmente exento de ADN no vírico y tiene menos de aproximadamente el 0,08 % de ADN de la célula hospedadora; y está esencialmente exento de proteínas no víricas y tiene menos de aproximadamente un 3 % de proteínas de las células hospedadoras.

5 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la cromatografía de intercambio aniónico comprende: a) una etapa opcional de preequilibrado de intercambio aniónico, que comprende preequilibrar una columna de intercambio aniónico con un tampón de preequilibrado de intercambio aniónico; b) una etapa de carga de intercambio aniónico, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra
10 de cromatografía post-HA en la columna de intercambio aniónico; c) una etapa opcional de equilibrado de intercambio aniónico, que comprende equilibrar la columna de intercambio aniónico con un tampón de equilibrado de intercambio aniónico; d) una etapa opcional de preelución de intercambio aniónico, que comprende preeluir la columna de intercambio aniónico con un tampón de preelución de intercambio aniónico; y e) una etapa de elución de intercambio aniónico, que comprende eluir la columna de intercambio aniónico con un tampón de elución de intercambio aniónico.
15 En algunas realizaciones, el método comprende además una segunda etapa de elución de intercambio aniónico que comprende eluir la columna de intercambio aniónico con un segundo tampón de elución de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, un primer eluato de intercambio aniónico y un segundo eluato de intercambio aniónico se recogen de la primera etapa de elución de intercambio aniónico y de la segunda etapa de elución de intercambio aniónico, respectivamente, y en donde el primer eluato de intercambio aniónico y el segundo eluato de intercambio
20 aniónico comprenden virus con diferente estructura, pureza o composición de proteína del virus.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la cromatografía en HA comprende: a) una etapa opcional de preequilibrado de HA, que comprende preequilibrar una columna de HA con un tampón de preequilibrado de HA; b) una etapa de carga de HA, que comprende cargar la
25 muestra biológica o una muestra de cromatografía postintercambio aniónico en la columna de HA; c) una etapa opcional de equilibrado de HA, que comprende equilibrar la columna de HA con un tampón de equilibrado de HA; d) una etapa opcional de preelución de HA, que comprende preeluir la columna de HA con un tampón de preelución de HA; y e) una etapa de elución de HA, que comprende eluir la columna de HA con un tampón de elución de HA. En algunas realizaciones, el método comprende además una segunda etapa de elución de HA que comprende eluir la
30 columna de HA con un segundo tampón de elución de HA. En algunas realizaciones, se recogen un primer eluato de HA y un segundo eluato de HA de la primera etapa de elución de HA y de la segunda etapa de elución de HA, respectivamente, y en donde el primer eluato de HA y el segundo eluato de HA comprenden virus con diferente estructura, pureza o composición de proteína del virus.

35 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, no hay cromatografía intermedia entre el intercambio aniónico y la HA. En algunas realizaciones, no hay ninguna etapa intermedia entre el intercambio aniónico y la HA.

En algunas realizaciones, la cromatografía de intercambio aniónico es cromatografía Capto-DEAE. En algunas
40 realizaciones, el tampón de preequilibrado de intercambio aniónico es un tampón de fosfato. En algunas realizaciones, el tampón de equilibrado de intercambio aniónico es un tampón de fosfato. En algunas realizaciones, el tampón de preelución de intercambio aniónico es un tampón de fosfato. En algunas realizaciones, el tampón de elución de intercambio aniónico es un tampón de fosfato. En algunas realizaciones, el tampón de elución de II comprende además cloruro de sodio. En algunas realizaciones, el tampón de elución de II comprende además cloruro de sodio. En
45 algunas realizaciones, la cromatografía en hidroxipatita es cromatografía CHT. En algunas realizaciones, el tampón de preequilibrado de HA es un tampón de fosfato. En algunas realizaciones, el tampón de equilibrado de HA es un tampón de fosfato. En algunas realizaciones, el tampón de preelución de HA es un tampón de fosfato. En algunas realizaciones, el tampón de elución de HA es un tampón de fosfato.

50 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el método comprende además una etapa de inactivación del virus. En algunas realizaciones, la etapa de inactivación del virus se realiza antes de la cromatografía de intercambio aniónico, la cromatografía en HA, o ambas. En algunas realizaciones, la etapa de inactivación del virus se realiza después de la cromatografía de intercambio aniónico, la cromatografía en HA, o ambas. En algunas realizaciones, la etapa de inactivación comprende inactivar el virus con un
55 agente inactivador.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la muestra biológica se somete a una etapa de aclarado antes de cargarla en la columna de intercambio aniónico o HA. En algunas realizaciones, la etapa de aclarado comprende la microfiltración a través de un microfiltro que tiene un
60 tamaño de poro de 0,1-0,5 µm.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la muestra biológica no se somete a centrifugación o ultrafiltración antes de cargarla en la columna de intercambio aniónico o HA.

65 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la

muestra biológica es una muestra de recogida de virus. En algunas realizaciones, la muestra de recogida de virus deriva de un cultivo de tejido animal, tejido aviar, células animales primarias o células con pases.

5 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el método comprende además obtener la muestra biológica. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene recogiendo un virus de la rabia con tejido animal, tejido aviar, células animales primarias o células con pases.

10 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el método comprende además combinar el virus de la rabia aislado con un estabilizador. En algunas realizaciones, el estabilizador comprende sacarosa y albúmina. En algunas realizaciones, la albúmina es albúmina sérica humana. En algunas realizaciones, la relación en peso de sacarosa en la mezcla es de aproximadamente el 0,5-10 %. En algunas realizaciones, la relación en peso de albúmina en la mezcla es de aproximadamente el 1-20 %.

15 También se desvelan composiciones que comprenden el virus de la rabia aislado obtenido de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunos aspectos, la composición es una vacuna vírica.

Aunque no se reivindica, la presente divulgación proporciona además composiciones víricas que comprenden partículas de virus de la rabia, en donde al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición es proteína vírica, en donde la proteína vírica comprende: al menos aproximadamente el 35-48 % de proteína G. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína del virus comprende además: aproximadamente el 28-37 % de proteína N; aproximadamente el 8-12 % de proteína P; y aproximadamente el 13-16 % de proteína M. En algunos aspectos de la divulgación, al menos aproximadamente el 80 % de las partículas de virus de la rabia en la composición son partículas víricas intactas. En algunos aspectos de la divulgación, la integridad de las partículas de virus puede determinarse por el tamaño, la forma, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH), las características biofísicas o bioquímicas (por ejemplo, la glicosilación de proteínas de membrana externa). En algunos aspectos de la divulgación, la composición está sustancialmente exenta de ADN no vírico. En algunos aspectos de la divulgación, la composición tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es estable durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 meses a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende además un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, el pH de la composición es de aproximadamente 7,5-7,7. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es de color blanco cuando es sólida y en donde una solución de la composición es transparente. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de agua de la composición es inferior al 3 %. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de la composición en ensayo de estabilidad a largo plazo es de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunas realizaciones, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de la composición en ensayo de estabilidad térmica es de al menos 3 UI/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de albúmina sérica bovina (BSA) es inferior a aproximadamente 10 ng/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es una composición de vacuna vírica. En algunos aspectos de la divulgación, la composición se liofiliza.

Breve descripción de los dibujos

45 La **FIG. 1** muestra los resultados de la electroforesis de SDS-page del virus de la rabia purificado recogido de diferentes fuentes como se describe en el Ejemplo 1. Las bandas N.º 1-3 representan el virus purificado recogido de las células Vero en matraces cuadrados. La banda N.º 4 representa el marcador de proteína; las bandas 5-7 representan el virus purificado recogido de células Vero en matraces giratorios; las bandas 8-10 representan el virus purificado recogido de células Vero en un biorreactor.

50 La **FIG. 2** muestra los resultados de la electroforesis de SDS-page de las muestras del virus de la rabia en diferentes fases del proceso de purificación como se describe en el Ejemplo 1. El marcador representa la muestra de referencia que indica el peso molecular patrón de las proteínas. "Mr" es el peso molecular de la proteína de cada banda (en KD). La banda N.º 1 representa la muestra de virus recogida del cultivo de recogida. La banda N.º 2 representa el eluato recogido de la cromatografía de intercambio iónico. Las bandas N.º 3-4 representan el eluato recogido de la cromatografía en hidroxipatita. La banda N.º 3 representa la muestra de virus antes de la desalinización. La banda N.º 4 representa la muestra de virus después de la desalinización.

55 La **FIG. 3** muestra los resultados de la electroforesis de SDS-page de las soluciones madre de virus en tres experimentos repetidos como se describe en el Ejemplo 3 (virus de la rabia recogido de células Vero). El marcador representa la muestra de referencia que indica el peso molecular patrón de las proteínas. El peso molecular de cada banda de la muestra de referencia estaba marcado a la izquierda. Las bandas 1-3 representan los tres ensayos independientes de las soluciones madre de virus.

60 La **FIG. 4** muestra una imagen de microscopía electrónica representativa del virus de la rabia en la solución madre de virus como se describe en el Ejemplo 3.

65 La **FIG. 5** muestra los resultados de la electroforesis de SDS-page de las soluciones madre de virus en tres experimentos repetidos como se describe en el Ejemplo 4 (virus de la rabia recogido de células MRC-5). El marcador representa la muestra de referencia que indica el peso molecular patrón de las proteínas. El peso molecular de cada banda de la muestra de referencia estaba marcado a la derecha. Las bandas 1-3 representan

los tres ensayos independientes de las soluciones madre de virus.

La **FIG. 6** muestra los resultados de la electroforesis de SDS-page de las soluciones madre de virus en tres experimentos repetidos como se describe en el Ejemplo 5 (virus de la rabia recogido de embrión de pollo). El marcador representa la muestra de referencia que indica el peso molecular patrón de las proteínas. El peso molecular de cada banda de la muestra de referencia estaba marcado a la izquierda. Las bandas 1-3 representan los tres ensayos independientes de las soluciones madre de virus.

La **FIG. 7** muestra los resultados de la electroforesis de SDS-page de las soluciones madre del virus de la encefalitis japonesa obtenidas a partir de diferentes métodos de purificación como se describe en el Ejemplo 7. El marcador representa la muestra de referencia que indica el peso molecular patrón de las proteínas. El peso molecular de cada banda de la muestra de referencia estaba marcado a la izquierda. La banda 1 representa la muestra de recogida de virus. La banda 2 representa la solución madre de virus obtenida por ultracentrifugación. La banda 3 representa la solución madre de virus obtenida de la filtración en gel. La banda 4 representa la solución madre de virus obtenida según los métodos descritos en el Ejemplo 7 (cromatografía de intercambio iónico y cromatografía en hidroxiapatita).

La **FIG. 8** muestra una imagen de microscopía electrónica representativa del virus de la encefalitis japonesa en la solución madre de virus como se describe en el Ejemplo 7.

La **FIG. 9** muestra los resultados de la electroforesis de SDS-page de las soluciones madre del virus de la gripe obtenidas a partir de diferentes métodos de purificación como se describe en el Ejemplo 8. El marcador representa la muestra de referencia que indica el peso molecular patrón de las proteínas. El peso molecular de cada banda de la muestra de referencia estaba marcado a la derecha. La banda 1 representa la muestra de recogida de virus. La banda 2 representa la solución madre de virus obtenida por ultracentrifugación. La banda 3 representa la solución madre de virus obtenida de la filtración en gel. La banda 4 representa la solución madre de virus obtenida según los métodos descritos en el Ejemplo 8 (cromatografía de intercambio iónico y cromatografía en hidroxiapatita).

La **FIG. 10** muestra una imagen de microscopía electrónica representativa del virus de la gripe en la solución madre de virus como se describe en el Ejemplo 8.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un método de purificación del virus de la rabia, como se define en las reivindicaciones. También se describen, pero no se reivindican, métodos de purificación de otros virus con envoltura.

Por lo tanto, la divulgación técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de las reivindicaciones. Los elementos de la divulgación que no entran en el alcance de las reivindicaciones se proporcionan a título informativo.

La presente divulgación proporciona métodos de purificación de un virus con envoltura a partir de una muestra biológica, que comprende someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio iónico ("II") y una cromatografía en hidroxiapatita ("HA") y composiciones que comprenden el virus con envoltura aislado obtenido de acuerdo los métodos descritos en el presente documento. La presente divulgación también proporciona composiciones víricas que comprenden partículas de virus de la rabia, en donde al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición es proteína vírica, y/o en donde la proteína vírica comprende: al menos aproximadamente el 35-48 % de proteína G. La presente divulgación comprende además métodos de evaluación de la idoneidad de una composición de vacuna vírica que comprende partículas de virus de la rabia para su uso clínico, o métodos de liberación de un lote comercial de una composición de vacuna vírica que comprende partículas de virus de la rabia para su uso clínico, que comprende determinar el porcentaje de proteínas víricas de la proteína total en la composición y determinar el porcentaje relativo de proteína G en las proteínas víricas.

Los virus con envoltura son microorganismos estrictamente parasitarios que requieren el uso de otros organismos (es decir, células hospedadoras) como sustratos celulares. Durante la recogida de virus, por lo general se forman en primer lugar partículas de virus, a lo que sigue la unión de los oligosacáridos a la proteína de membrana externa. En algunas ocasiones, el porcentaje relativo de los oligosacáridos puede llegar a ser superior al 75 % de la proteína de membrana externa. Las partículas de virus producidas por lotes diferentes (de la misma clase de células hospedadoras, de diferente clase de células hospedadoras, las mismas células hospedadoras o diferentes células hospedadoras) son heterogéneas en estructura y/o composición. Por lo general, las principales diferencias están en la estructura y/o composición de la proteína de membrana externa, por ejemplo, el número de copias y la glicosilación de la proteína de membrana externa. Las diferencias pueden estar presentes cuando las partículas de virus se ensamblan y/o pueden originarse después de que las partículas de virus se liberen en el cultivo de recogida, por ejemplo, se dañen por proteasa, glicosil hidrolasa o cizalla por fuerza mecánica.

Durante la recogida de virus, las células hospedadoras están en apoptosis, necrosis y/u otros procesos biológicos dañinos. El ADN de la célula hospedadora se cizalla en diferentes tamaños de fragmentos y se libera en el medio de cultivo. También se liberan en el medio de cultivo sustancias intracelulares tales como diversos orgánulos, residuos celulares, diferentes hidratos de carbono, lípidos y diversas proteínas en diferentes tamaños.

En consecuencia, la solución de recogida de virus por lo general contiene múltiples impurezas. Muchos de ellos tienen

un tamaño similar al de las partículas de virus. Un ejemplo son las proteínas de alto peso molecular derivadas de células hospedadoras. Las células hospedadoras pueden expresar más de 20.000 clases de proteínas con diferentes tamaños. Muchas proteínas existen en forma de multímeros. Por lo tanto, las proteínas de la célula hospedadora en el cultivo de recogida de virus son una mezcla compleja que incluye muchas que tienen un tamaño cercano al de las partículas de virus. Otro ejemplo es el ADN de la célula hospedadora. Como se ha analizado anteriormente, durante la apoptosis, la necrosis y otros procesos dañinos en la recogida de virus, se liberan en el cultivo fragmentos de ADN de diferentes tamaños. Por lo tanto, el DNA de la célula hospedadora en el cultivo de recogida de virus es también una mezcla compleja que incluye muchos que tienen un tamaño cercano al de las partículas de virus. Otro ejemplo es el suero (por ejemplo, suero bovino) que se usa para complementar el medio de cultivo. De forma importante, otro ejemplo son los derivados estructurales derivados de los propios virus con envoltura. Durante la recogida de virus, una porción de las partículas de virus ensambladas está incompleta o es menos preferible. Como ejemplos, algunas partículas de virus tienen un número bajo de copias de proteínas de membrana externa y/o tienen una glicosilación incompleta o menos preferible de las proteínas de membrana externa. Estas partículas de virus pueden tener un tamaño comparable al de las partículas de virus intactas y/o preferibles, pero tienen diferencias significativas en sus funciones biológicas y propiedades inmunitarias (tales como la potencia). Como anteriormente, los métodos basados en tamices moleculares (tales como ultracentrifugación en gradiente de densidad o cromatografía de filtración en gel) son menos satisfactorios puesto que no pueden separar satisfactoriamente las partículas de virus intactas y/o preferibles de las impurezas en tamaños comparables tales como aquellos descritos anteriormente.

Además, la proteína o proteínas de membrana externa son muy frágiles y se dañan o destruyen fácilmente según los métodos tales como la ultrafiltración. Por lo tanto, los procesos de purificación que emplean dichos métodos pueden dar como resultado un mayor grado de heterogeneidad de las partículas de virus (por ejemplo, un mayor porcentaje de partículas de virus incompletas y/o menos preferibles). Adicionalmente, las condiciones de purificación existentes con frecuencia necesitan cambiarse en gran medida cuando se cambian los métodos de recogida. También es difícil garantizar la producción de virus purificado estable cuando se purifican diferentes lotes de partículas de virus recogidas mediante el mismo método de recogida.

Un ejemplo del virus con envoltura es el virus de la rabia. Las partículas de virus de la rabia consisten en un ARN monocatenario (que consiste en aproximadamente 11.930 nucleótidos) y cinco proteínas, incluyendo las proteínas L, P, G, M y N. Junto con el ARN monocatenario, 20-150 proteínas L y 950 proteínas P forman una nucleocápside estructuralmente estable. La nucleocápside está encapsulada por la membrana lipídica bicapa derivada de las células hospedadoras. Aproximadamente 1650 proteínas M se ubican entre la nucleocápside y la membrana lipídica. Diferentes cantidades (es decir, número de copias) de la proteína G se ubican en la superficie de la membrana lipídica. Diferentes cantidades y longitudes de oligosacáridos se unen a la proteína G. El número de copias y el grado de glicosilación de la proteína G tienen un impacto crítico en las propiedades biológicas e inmunitarias de las partículas víricas.

Los cultivos que pueden usarse para recoger el virus de la rabia incluyen cerebro de ratón, embrión de pollo, embrión de pato, células primarias de riñón de hámster, fibroblasto de embrión de pollo, células diploides humanas y células Vero. No importa qué cultivo se use, el cultivo de recogida de virus de la rabia es siempre una mezcla de componentes complejos que incluyen diversas estructuras y/o composiciones de partículas de virus y diversas impurezas.

El tamaño de una partícula del virus de la rabia intacta es de aproximadamente 75 x 180 nm. Tiene un peso molecular de aproximadamente 5×10^8 - 8×10^8 , coeficiente de sedimentación de 600S, densidad de flotación en solución de sacarosa de 1,14-1,17 g/ml. El diámetro de las células exfoliadas es de aproximadamente 5 µm. La mayoría de los residuos celulares tienen un diámetro de más de 0,8 µm, que es significativamente más grande que el de las partículas de virus de la rabia. La mayoría de las proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ARN (principalmente ARNt y ARNr) de la célula hospedadora tienen un peso molecular inferior a 1.000 kD, que son significativamente más pequeños que las partículas de virus de la rabia. Los ARN mensajeros son más grandes pero muy inestables, por lo tanto, existen muy pocos de ellos en el cultivo de recogida. El ADN de la célula hospedadora incluye ADN y fragmentos que son más grandes o más pequeños que las partículas de virus de la rabia, o comparables en tamaño al virus de la rabia. Los derivados estructurales de las partículas de virus de la rabia también incluyen aquellos más grandes (por ejemplo, agregación vírica), más pequeños (por ejemplo, macromoléculas de subunidades víricas debido a la lisis vírica, fragmentación o fallo del ensamblaje adecuado) o comparable en tamaño (por ejemplo, partículas de virus con número de copias no preferibles y/o grado no preferible de glicosilación en la proteína de membrana externa como se analizó anteriormente) en comparación con el virus de la rabia intacto y/o preferible.

Los métodos existentes para purificar partículas de virus de la rabia y producir vacuna contra la rabia humana usan principalmente métodos de tamices moleculares (tales como aprovechar las diferencias en el peso molecular y la densidad de flotación). Por ejemplo, los primeros productos usaban microfiltración para eliminar residuos de tejido, células exfoliadas o residuos celulares. Posteriormente, con el fin de mejorar la potencia de la vacuna contra la rabia, se añadió la técnica de concentración por ultrafiltración para eliminar pequeñas impurezas moleculares. La pureza de la vacuna contra la rabia mejoró adicionalmente mediante la técnica de ultracentrifugación de zona de sacarosa establecida en los años 70 y la cromatografía de filtración en gel establecida en los años 90. Desde entonces, el proceso de purificación de la vacuna contra la rabia humana no presenta mayores mejoras. Se emplean métodos de purificación similares que incluyen: aclarado del cultivo de recogida de virus con microfiltración, seguido de

concentración por ultrafiltración, ultracentrifugación en zona de sacarosa y/o cromatografía en columna de filtración en gel.

Sin embargo, los métodos existentes para la purificación de partículas de virus de la rabia son menos satisfactorios debido a las siguientes razones. En primer lugar, la vacuna producida tiene una baja pureza de las partículas de virus. La cantidad de impurezas dañinas en el producto de vacuna es alta, dando como resultado reacciones adversas en los usuarios de la vacuna. Estas impurezas dañinas incluyen ADN y proteínas derivadas de células hospedadoras, albúmina sérica de origen animal (tal como albúmina sérica bovina) y complejo de β -propiolactona-albúmina humana formado durante la inactivación de virus.

En segundo lugar, la vacuna contiene una dosis baja del principio activo. Debido a la gran cantidad de impurezas, no pueden realizarse análisis y/o métodos físicos y químicos rápidos y precisos para detectar y controlar la dosificación del principio activo. Más bien, se confía en la potencia (ensayo de NIH) y la concentración de antígeno (prueba ELISA) para evaluar la dosificación del principio activo. Sin embargo, los resultados de los dos métodos fueron menos precisos, especialmente el primero. (Basándose en datos publicados por el Comité de Expertos de la OMS, la desviación del ensayo de NIH varía entre el 25 % y el 400 %). El ensayo ELISA detecta la cantidad total de partículas de virus sin distinguir la dosificación del principio activo y las impurezas, tales como derivaciones estructurales de las partículas de virus como se ha analizado anteriormente. Por lo tanto, el resultado del ensayo ELISA no refleja con precisión la potencia biológica de la vacuna. Debido a que la dosis del principio activo no puede detectarse ni controlarse con precisión, una dosis de la vacuna puede tener una cantidad de dosificación activa menos que suficiente o más que suficiente, lo que puede conducir a un fracaso de la inmunogenicidad o un mayor riesgo o incidencia de reacciones adversas.

En tercer lugar, la formulación de vacuna es compleja y tiene poca estabilidad. Debido a la baja pureza de las partículas de virus, se añade una gran cantidad de agentes protectores para mantener la estabilidad del producto de vacuna. El exceso de agentes protectores no sólo aumenta la carga metabólica del usuario, sino que también aumenta el coste de producción.

La presente divulgación proporciona métodos para producir partículas de virus con envoltura altamente intactas, homogéneas y estables sometiendo la muestra de virus a cromatografía de intercambio iónico ("II") y cromatografía en hidroxipatita ("HA"). En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para purificar selectivamente partículas de virus con propiedades y/o composiciones preferidas de la proteína o proteínas de membrana externa en la superficie del virus con envoltura. Las propiedades y composiciones de la proteína de membrana externa incluyen las composiciones de aminoácidos, las cargas (por ejemplo, las cargas netas), el grado de fosforilación, el grado de glicosilación y el número de copias de las proteínas de membrana externa. En algunos aspectos, los métodos comprenden una etapa de aclarado y/o una etapa de concentración menos duras para conservar la integridad de las partículas de virus mediante microfiltración a través de un microfiltro en comparación con la ultracentrifugación y la ultrafiltración. En algunos aspectos, los métodos comprenden una etapa de combinar la composición vírica con un estabilizador que comprende sacarosa y albúmina, en donde el estabilizador no comprende gelatina, dextrano, trehalosa, tensioactivos y/o proteínas animales. En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones víricas (tales como vacunas víricas) que comprenden partículas víricas (tales como partículas de virus de la rabia) que tienen una alta pureza y un porcentaje relativo preferido de proteína o proteínas de membrana externa.

Definiciones

A menos que se indique específicamente otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entienden normalmente aquellos expertos habituales en la materia a la que pertenece la presente invención. Además, cualquier método o material similar o equivalente a un método o material descrito en el presente documento puede usarse en la práctica de la presente invención. Para los fines de la presente invención, se definen los siguientes términos.

Se entiende que las realizaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen realizaciones "que consisten" y/o "que consisten esencialmente en".

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo, una descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

La expresión "aproximadamente X-Y" utilizada en el presente documento tiene el mismo significado que "de aproximadamente X a aproximadamente Y". La expresión "aproximadamente X, Y o Z" utilizada en el presente documento tiene el mismo significado que "aproximadamente X, aproximadamente Y o aproximadamente Z".

Como se usa en el presente documento, la referencia a "no" un valor o parámetro generalmente significa y describe "distinto de" un valor o parámetro. Por ejemplo, el método no se usa para tratar el cáncer de tipo X significa que el método se usa para tratar el cáncer de tipos distintos del X.

Los términos "un", "una", o "el/la", como se usan en el presente documento, no sólo incluyen aspectos con un miembro, sino que también incluyen aspectos con más de un miembro. Por ejemplo, las formas en singular "un", "una", y "el/la" incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a "el agente" incluye la referencia a uno o más agentes conocidos por los expertos en la materia y así sucesivamente.

Método de aislamiento de virus

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un método de purificación de un virus con envoltura a partir de una muestra biológica, que comprende someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio iónico ("II") y una cromatografía en hidroxipatita ("HA"). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxipatita se realiza después de la cromatografía de intercambio iónico. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio iónico se realiza después de la cromatografía en hidroxipatita. En algunos aspectos de la divulgación, no hay cromatografía intermedia entre el II y la HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II es cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxipatita es cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se selecciona del grupo que consiste en el virus de la rabia, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene un pH de 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA comprende un tampón de fosfato y tiene un pH de 7,0-9,5.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un método de purificación de un virus con envoltura a partir de una muestra biológica, que comprende someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio iónico ("II") y una cromatografía en hidroxipatita ("HA"), en donde la cromatografía de II comprende: a) una etapa opcional de preequilibrado de II, que comprende preequilibrar una columna de intercambio iónico con un tampón de preequilibrado de intercambio iónico; b) una etapa de carga de II, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-HA en la columna de intercambio iónico; c) una etapa opcional de equilibrado de II, que comprende equilibrar la columna de intercambio iónico con un tampón de equilibrado de II; d) una etapa opcional de preelución de II, que comprende preluir la columna de intercambio iónico con un tampón de preelución de II; y e) una etapa de elución de II, que comprende eluir la columna de II con un tampón de elución de II. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxipatita se realiza después de la cromatografía de intercambio iónico. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio iónico se realiza después de la cromatografía en hidroxipatita. En algunos aspectos de la divulgación, no hay cromatografía intermedia entre el II y la HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II es cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxipatita es cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se selecciona de la lista que comprende el virus de la rabia, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene un pH de 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA comprende un tampón de fosfato y tiene un pH de 7,0-9,5.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un método de purificación de un virus con envoltura a partir de una muestra biológica, que comprende someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio iónico ("II") y una cromatografía en hidroxipatita ("HA"), en donde la cromatografía en HA comprende: a) una etapa opcional de preequilibrado de HA, que comprende preequilibrar una columna de HA con un tampón de preequilibrado de HA; b) una etapa de carga de HA, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-II en la columna de HA; c) una etapa opcional de equilibrado de HA, que comprende equilibrar la columna de HA con un tampón de equilibrado de HA; d) una etapa opcional de preelución de HA, que comprende preluir la columna de HA con un tampón de preelución de HA; y e) una etapa de elución de HA, que comprende eluir la columna de HA con un tampón de elución de HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxipatita se realiza después de la cromatografía de intercambio iónico. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio iónico se realiza después de la cromatografía en hidroxipatita. En algunos aspectos de la divulgación, no hay cromatografía intermedia entre el II y la HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II es cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxipatita es cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se selecciona de la lista que comprende el virus de la rabia, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene un pH de 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA comprende un tampón de fosfato y tiene un pH de 7,0-9,5.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un método de purificación de un virus con envoltura a partir de una muestra biológica, que comprende someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio iónico ("II")

y una cromatografía en hidroxapatita ("HA"), en donde la cromatografía de II comprende: a) una etapa opcional de preequilibrado de II, que comprende preequilibrar una columna de intercambio iónico con un tampón de preequilibrado de intercambio iónico; b) una etapa de carga de II, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-HA en la columna de intercambio iónico; c) una etapa opcional de equilibrado de II, que comprende equilibrar la columna de intercambio iónico con un tampón de equilibrado de II; d) una etapa opcional de preelución de II, que comprende preeluir la columna de intercambio iónico con un tampón de preelución de II; y e) una etapa de elución de II, que comprende eluir la columna de II con un tampón de elución de II, y en donde la cromatografía en HA comprende: a) una etapa opcional de preequilibrado de HA, que comprende preequilibrar una columna de HA con un tampón de preequilibrado de HA; b) una etapa de carga de HA, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-II en la columna de HA; c) una etapa opcional de equilibrado de HA, que comprende equilibrar la columna de HA con un tampón de equilibrado de HA; d) una etapa opcional de preelución de HA, que comprende preeluir la columna de HA con un tampón de preelución de HA; y e) una etapa de elución de HA, que comprende eluir la columna de HA con un tampón de elución de HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita se realiza después de la cromatografía de intercambio iónico. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio iónico se realiza después de la cromatografía en hidroxapatita. En algunos aspectos de la divulgación, no hay cromatografía intermedia entre el II y la HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II es cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita es cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se selecciona de la lista que comprende el virus de la rabia, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene un pH de 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA comprende un tampón de fosfato y tiene un pH de 7,0-9,5.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un método de purificación de un virus con envoltura a partir de una muestra biológica, que comprende 1) someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio iónico ("II") y una cromatografía en hidroxapatita ("HA"), y 2) una etapa de inactivación del virus, en donde la etapa de inactivación puede realizarse antes de, después o entre la cromatografía en HA y la cromatografía de II. En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de inactivación del virus se realiza después de la cromatografía de II y la cromatografía en HA. En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de inactivación comprende inactivar el virus con un agente inactivador. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita se realiza después de la cromatografía de intercambio iónico. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio iónico se realiza después de la cromatografía en hidroxapatita. En algunos aspectos de la divulgación, no hay cromatografía intermedia entre el II y la HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II es cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita es cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se selecciona de la lista que comprende el virus de la rabia, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene un pH de 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA comprende un tampón de fosfato y tiene un pH de 7,0-9,5.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un método de purificación de un virus con envoltura a partir de una muestra biológica, que comprende 1) una etapa de aclarado; y 2) someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio iónico ("II") y una cromatografía en hidroxapatita ("HA"), en donde la etapa de aclarado puede realizarse antes de, después o entre la cromatografía en HA y la cromatografía de II. En algunos aspectos de la divulgación, la muestra biológica se somete a una etapa de aclarado antes de cargarla en la columna de II o HA. En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de aclarado comprende la microfiltración a través de un microfiltro que tiene un tamaño de poro de 0,1-0,5 µm. En algunos aspectos de la divulgación, la muestra biológica no se somete a centrifugación o ultrafiltración antes de cargarla en la columna de II o HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita se realiza después de la cromatografía de intercambio iónico. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio iónico se realiza después de la cromatografía en hidroxapatita. En algunos aspectos de la divulgación, no hay cromatografía intermedia entre el II y la HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II es cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita es cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se selecciona de la lista que comprende el virus de la rabia, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene un pH de 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA comprende un tampón de fosfato y tiene un pH de 7,0-9,5.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un método de purificación de un virus con envoltura a partir de una muestra biológica, que comprende 1) una etapa de aclarado; 2) una etapa de inactivación; y 3) someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio iónico ("II") y una cromatografía en hidroxapatita ("HA"), en donde la etapa de aclarado, la etapa de inactivación, la cromatografía de II y la cromatografía en HA pueden realizarse en cualquier orden. En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de aclarado comprende la microfiltración a través de

un microfiltro que tiene un tamaño de poro de 0,1-0,5 µm. En algunos aspectos de la divulgación, la muestra biológica no se somete a centrifugación o ultrafiltración antes de cargarla en la columna de II o HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita se realiza después de la cromatografía de intercambio iónico. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio iónico se realiza después de la cromatografía en hidroxapatita. En algunos aspectos de la divulgación, no hay cromatografía intermedia entre el II y la HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II es cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita es cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se selecciona de la lista que comprende el virus de la rabia, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene un pH de 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA comprende un tampón de fosfato y tiene un pH de 7,0-9,5.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un método de purificación de un virus con envoltura a partir de una muestra biológica, que comprende 1) obtener la muestra biológica mediante la proliferación del virus en un cultivo y 2) someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio iónico ("II") y una cromatografía en hidroxapatita ("HA"). En algunos aspectos de la divulgación, la muestra biológica deriva de un cultivo de tejido animal, tejido aviar, células animales primarias o células con pases. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita se realiza después de la cromatografía de intercambio iónico. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio iónico se realiza después de la cromatografía en hidroxapatita. En algunos aspectos de la divulgación, no hay cromatografía intermedia entre el II y la HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II es cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita es cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se selecciona de la lista que comprende el virus de la rabia, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene un pH de 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA comprende un tampón de fosfato y tiene un pH de 7,0-9,5.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un método de purificación de un virus con envoltura a partir de una muestra biológica, que comprende 1) obtener la muestra biológica mediante la proliferación del virus en un cultivo; 2) someter la muestra biológica a una etapa de aclarado; y 3) someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio iónico ("II") y una cromatografía en hidroxapatita ("HA"), en donde la etapa de aclarado puede realizarse antes de, entre o después de la cromatografía en HA y la cromatografía de II. En algunos aspectos de la divulgación, la muestra biológica se somete a una etapa de aclarado antes de cargarla en la columna de II o HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita se realiza después de la cromatografía de intercambio iónico. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio iónico se realiza después de la cromatografía en hidroxapatita. En algunos aspectos de la divulgación, no hay cromatografía intermedia entre el II y la HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II es cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita es cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se selecciona de la lista que comprende el virus de la rabia, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene un pH de 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA comprende un tampón de fosfato y tiene un pH de 7,0-9,5.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un método de purificación de un virus con envoltura a partir de una muestra biológica, que comprende 1) obtener la muestra biológica mediante la proliferación del virus en un cultivo; 2) someter la muestra biológica a una etapa de aclarado; y 3) someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio iónico ("II") y una cromatografía en hidroxapatita ("HA"), 4) una etapa de inactivación del virus. En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de inactivación del virus se realiza después de la cromatografía de II y la cromatografía en HA. En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de aclarado se realiza antes de la cromatografía de II y la cromatografía en HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita se realiza después de la cromatografía de intercambio iónico. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio iónico se realiza después de la cromatografía en hidroxapatita. En algunos aspectos de la divulgación, no hay cromatografía intermedia entre el II y la HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II es cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxapatita es cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se selecciona de la lista que comprende el virus de la rabia, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene un pH de 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA comprende un tampón de fosfato y tiene un pH de 7,0-9,5.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un método de purificación de un virus con envoltura a partir de una muestra biológica, que comprende 1) someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio iónico ("II") y una cromatografía en hidroxiapatita ("HA"), y 2) combinar el virus aislado con un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina es albúmina sérica humana. En algunos aspectos de la divulgación, la relación en peso de sacarosa en la mezcla es de aproximadamente el 0,5-10 %. En algunos aspectos de la divulgación, la relación en peso de albúmina en la mezcla es de aproximadamente el 1-20 %. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxiapatita se realiza después de la cromatografía de intercambio iónico. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio iónico se realiza después de la cromatografía en hidroxiapatita. En algunos aspectos de la divulgación, no hay cromatografía intermedia entre el II y la HA. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II es cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en hidroxiapatita es cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se selecciona de la lista que comprende el virus de la rabia, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene un pH de 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA comprende un tampón de fosfato y tiene un pH de 7,0-9,5.

A. Cromatografía de intercambio iónico (II)

Los métodos descritos en el presente documento comprenden una etapa de cromatografía de II que comprende 1) una etapa de carga de II que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-HA en la columna de intercambio iónico; y 2) una etapa de elución de II, que comprende eluir la columna de II con un tampón de elución de II. En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden además una etapa de equilibrado de II, que comprende equilibrar la columna de intercambio iónico con un tampón de equilibrado de II; una etapa de preequilibrado de II, que comprende preequilibrar una columna de intercambio iónico con un tampón de preequilibrado de intercambio iónico; y/o una etapa de preelución de II, que comprende preeluir la columna de intercambio iónico con un tampón de preelución de II.

En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden a) una etapa de carga de II, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-HA en la columna de intercambio iónico; b) una etapa de equilibrado de II, que comprende equilibrar la columna de intercambio iónico con un tampón de equilibrado de II; c) una etapa de elución de II, que comprende eluir la columna de II con un tampón de elución de II. En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden a) una etapa de preequilibrado de II, que comprende preequilibrar una columna de intercambio iónico con un tampón de preequilibrado de intercambio iónico; b) una etapa de carga de II, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-HA en la columna de intercambio iónico; c) una etapa de equilibrado de II, que comprende equilibrar la columna de intercambio iónico con un tampón de equilibrado de II; d) una etapa de elución de II, que comprende eluir la columna de II con un tampón de elución de II. En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden a) una etapa de preequilibrado de II, que comprende preequilibrar una columna de intercambio iónico con un tampón de preequilibrado de intercambio iónico; b) una etapa de carga de II, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-HA en la columna de intercambio iónico; c) una etapa de elución de II, que comprende eluir la columna de II con un tampón de elución de II. En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden a) una etapa de carga de II, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-HA en la columna de intercambio iónico; b) una etapa de equilibrado de II, que comprende equilibrar la columna de intercambio iónico con un tampón de equilibrado de II; c) una etapa de preelución de II, que comprende preeluir la columna de II con un tampón de preelución de II; y d) una etapa de elución de II, que comprende eluir la columna de II con un tampón de elución de II.

En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden a) una etapa de preequilibrado de II, que comprende preequilibrar una columna de intercambio iónico con un tampón de preequilibrado de intercambio iónico; b) una etapa de carga de II, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-HA en la columna de intercambio iónico; c) una etapa de equilibrado de II, que comprende equilibrar la columna de intercambio iónico con un tampón de equilibrado de II; d) una etapa de preelución de II, que comprende preeluir la columna de II con un tampón de preelución de II; y e) una etapa de elución de II, que comprende eluir la columna de II con un tampón de elución de II.

En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II comprende una cromatografía de intercambio aniónico (IA). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II comprende una cromatografía de intercambio catiónico.

Las condiciones de la cromatografía de II pueden determinarse de acuerdo con las propiedades de carga de una o más proteínas de membrana externa en la superficie del virus con envoltura. En algunos aspectos de la divulgación,

una o más proteínas de membrana externa en la superficie del virus con envoltura tienen carga o cargas positivas y se realiza una cromatografía de intercambio catiónico para purificar el virus con envoltura. En algunos aspectos de la divulgación, una o más proteínas de membrana externa en la superficie del virus con envoltura tienen carga o cargas negativas y se realiza una cromatografía de intercambio aniónico para purificar el virus con envoltura. En algunos aspectos de la divulgación, las propiedades de carga de la una o más proteínas de membrana externa se caracterizan por la carga neta de una o más proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, las propiedades de carga de la una o más proteínas de membrana externa se caracterizan por la carga neta de todas las proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, el virus con envoltura es el virus de la rabia y las propiedades de carga de la una o más proteínas de membrana en la superficie del virus con envoltura se caracterizan por la carga neta de la proteína G de membrana externa.

En algunos aspectos de la divulgación, las condiciones de la cromatografía de II se determinan de acuerdo con el número de copias de la una o más proteínas de membrana externa (por ejemplo, el número de copias de una proteína de membrana externa específica, una porción de la una o más proteínas de membrana externa y/o todas las proteínas de membrana externa en la superficie del virus) y/o el grado de glicosilación de la una o más proteínas de membrana externa (por ejemplo, el grado de glicosilación de una proteína de membrana externa específica, una porción de la una o más proteínas de membrana externa y/o todas las proteínas de membrana externa en la superficie del virus). En algunos aspectos de la divulgación, las condiciones de la cromatografía de II pueden ser una cualquiera o más de las siguientes: el tipo de la columna (por ejemplo, anión o catión), la columna específica a usar, las condiciones (por ejemplo, la concentración de iones, el pH, si el tampón específico comprende una sal, el tipo de sal, la concentración de sal y/o el volumen a aplicar) del tampón de preequilibrado, el tampón de equilibrado, el tampón de preelución y/o el tampón de elución, y/o el volumen de la muestra de virus o la cantidad de virus a cargar.

En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones en un tampón de elución es proporcional al número de copias de la una o más proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones en un tampón de elución es inversamente proporcional al grado de glicosilación de la una o más proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, el virus con envoltura tiene solamente una proteína de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones en un tampón de elución es proporcional al número de copias de la única proteína de membrana externa e inversamente proporcional al grado de glicosilación de la única proteína de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, la única proteína de membrana externa tiene un intervalo preferido de número de copias y/o un intervalo preferido de grado de glicosilación. Por ejemplo, el intervalo preferido de número de copias y/o un intervalo preferido de grado de glicosilación de la única proteína de membrana externa da como resultado una inmunogenicidad superior en un individuo. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones en un tampón de elución es proporcional al intervalo preferido de número de copias de la única proteína de membrana externa y/o inversamente proporcional al intervalo preferido de grado de glicosilación de la única proteína de membrana externa.

En algunos aspectos de la divulgación, la una o más proteínas de membrana externa tienen dos números de copias, o dos intervalos de número de copias (es decir, el primer intervalo de número de copias y el segundo intervalo de número de copias) y/o dos grados de glicosilación o dos intervalos de grados de glicosilación (es decir, el primer intervalo de grado de glicosilación y el segundo intervalo de grado de glicosilación). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II comprende una primera etapa de elución y una segunda etapa de elución, en donde la primera etapa de elución es eluir el primer lote de virus que comprende el primer intervalo de número de copias y/o el primer intervalo de grado de glicosilación, y en donde la segunda etapa de elución es eluir el segundo lote de virus que comprende el segundo intervalo de número de copias y/o el segundo intervalo de grado de glicosilación. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones en el primer tampón de elución es proporcional al primer intervalo de número de copias de la una o más proteínas de membrana externa e inversamente proporcional al primer intervalo del grado de glicosilación de la una o más proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones en el segundo tampón de elución es proporcional al segundo intervalo de número de copias de la una o más proteínas de membrana externa e inversamente proporcional al segundo intervalo del grado de glicosilación de la una o más proteínas de membrana externa.

Diferentes números de copias o números de copias preferidos (o intervalo preferido de número de copias) de la una o más proteínas de membrana externa pueden representarse por o convertirse en uno particular (por ejemplo, preferido) o un intervalo particular (por ejemplo, intervalo preferido) del porcentaje relativo de la proteína de membrana externa en la proteína vírica total. El particular (por ejemplo, preferido) o el intervalo particular (por ejemplo, intervalo preferido) del porcentaje relativo de la proteína de membrana externa en la proteína vírica total (por ejemplo, "la relación preferida de proteína de membrana externa") puede ser cualquier porcentaje relativo o cualquier intervalo de porcentajes relativos de la una o más proteínas de membrana externa. De forma similar, un grado particular de glicosilación (por ejemplo, un grado preferido de glicosilación, un intervalo preferido de grado de glicosilación) puede ser cualquier grado o intervalo de grado de glicosilación en la una o más proteínas de membrana externa. La relación particular/preferida de la proteína de membrana externa y el grado particular/preferido de glicosilación pueden determinarse de acuerdo con la finalidad de las partículas víricas. Las finalidades de ejemplo de usar las partículas de virus incluyen la preparación de vacunas y la investigación. En algunos aspectos de la divulgación, el virus que tiene la relación particular/preferida de la proteína de membrana externa tiene mayor potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) que la misma clase de virus que no tiene la relación particular/preferida de la proteína de membrana externa. En algunos

aspectos de la divulgación, una vacuna con el virus que tiene la relación particular/preferida de la proteína de membrana externa da como resultado una inmunogenicidad superior a la de una vacuna con la misma clase de virus que no tiene la relación particular/preferida de la proteína de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, el virus que tiene el grado de glicosilación particular/preferido en la proteína de membrana externa tiene mayor potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) que la misma clase de virus que no tiene el grado de glicosilación particular/preferido en la proteína de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, una vacuna con el virus que tiene el grado de glicosilación particular/preferido en la proteína de membrana externa da como resultado una inmunogenicidad superior a la de una vacuna con la misma clase de virus que no tiene el grado de glicosilación particular/preferido en la proteína de membrana externa.

1) Columna de II

En algunos aspectos de la divulgación, la columna de II es una cromatografía de intercambio aniónico (IA). La cromatografía de intercambio aniónico de ejemplo comprende un ligando con carga positiva unido a una fase sólida, tal como grupos amino cuaternarios, incluyendo, por ejemplo, una amina cuaternaria, tal como alquilamina cuaternaria y alquilalcanolamina cuaternaria, o amina, dietilamina, dietilaminoetilo (DEAE), dietilaminopropilo, amino, timetilamonoetilo, trimetilbencilamonio, dimetiletanolbencilamonio y poliamina. La cromatografía de intercambio aniónico de ejemplo incluye materiales de intercambio aniónico tales como DEAE celulosa, Poros PI 20, PI 50, HQ 10, HQ 20, HQ 50, D 50 de Applied Biosystems, MonoQ, MiniQ, Source 15Q y 30Q, Q, DEAE y ANX Sepharose Fast Flow, Q Sepharose de alto rendimiento, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ de GE Healthcare, WP PEI, WP DEAM, WP QUAT de J.T. Baker, Hydrocell DEAE y Hydrocell QA de Biochrom Labs Inc., UNOsphere Q, Macro-Prep DEAE y Macro-Prep High Q de BioRad, Ceramic HyperD Q, Ceramic HyperD DEAE, Q HyperZ, Trisacryl M y LS DEAE, Spheredex LS DEAE, QMA Spherosil LS, QMA Spherosil M de Pall Technologies, resinas aniónicas DOWEX de malla fina de base fuerte de tipo I y tipo II y DOWEX MONOSPHERE 77, anión de base débil de las separaciones de líquidos Dow, Matrex Cellufme A200, A500, Q500 y Q800, de Millipore, Fractogel® EMD TMAE, Fractogel® EMD DEAE y Fractogel® EMD DMAE de EMD, intercambiadores de aniones débiles y fuertes Amberlite de tipo I y II, intercambiadores de aniones débiles y fuertes DOWEX de tipo I y II, intercambiadores de aniones débiles y fuertes Diaion de tipo I y II, Duolite de Sigma-Aldrich, TSK gel Q y DEAE 5PW y 5PW-HR, Toyopearl® SuperQ-650S, 650M y 650C3 QAE-550C y 650S, DEAE-650M y 650C de Tosoh, y QA52, DE23, DE32, DE51, DE52, DE53, Express-Ion D y Express-Ion Q de Whatman. Las resinas de alta capacidad disponibles en el mercado incluyen GigaCap Q-650M (Tosoh), Capto Q (GE Healthcare), Eshmuno™ Q de EMD y Nuvia™ Q de Bio-rad. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de IA comprende una cromatografía en DEAE. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en DEAE se selecciona del grupo que consiste en cromatografía DEAE-Sepharose®, Capto®-DEAE y DEAE Celulosa. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en DEAE es cromatografía Capto®-DEAE. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de IA comprende una cromatografía en amonio cuaternario (Q). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía Q se selecciona del grupo que consiste en Q Sepharose®, Capto®-Q, Dowex®1X2, Amberlite®/Amberjet® y QAE Sephadex®.

En algunos aspectos de la divulgación, la columna de II es una cromatografía de intercambio catiónico. La cromatografía de intercambio catiónico de ejemplo comprende grupos con carga negativa unidos a una fase sólida tal como un grupo a base de sulfonato (por ejemplo, MonoS, MiniS, Source 15S y 30S, SP Sepharose Fast Flow™, SP Sepharose High Performance de GE Healthcare, Toyopearl® SP-650S y SP-650M de Tosoh, Macro-Prep High S de BioRad, Ceramic HyperD S, Trisacryl M y LS SP y Spheredex LS SP de Pall Technologies); un grupo a base de sulfoetilo (por ejemplo, Fractogel EMD SE de EMD, Poros S-10 y S-20 de Applied Biosystems); un grupo a base de sulfopropilo (por ejemplo, TSK Gel SP 5PW y SP-5P W-HR de Tosoh, Poros HS-20 y HS 50 de Applied Biosystems); un grupo a base de sulfoisobutilo (por ejemplo, Fractogel® EMD S03 de EMD); un grupo a base de sulfoxietilo (por ejemplo, SE52, SE53 y Express-Ion S de Whatman), un grupo a base de carboximetilo (por ejemplo, CM Sepharose Fast Flow de GE Healthcare, Hydrocell CM de Biochrom Labs Inc., Macro-Prep CM de BioRad, Ceramic HyperD CM, Trisacryl M CM, Trisacryl LS CM, de Pall Technologies, Matrex Cellufme C500 y C200 de Millipore, CM52, CM32, CM23 y Express - Ion C de Whatman, Toyopearl® CM- 650S, CM-650M y CM-650C de Tosoh); grupos a base de ácido sulfónico y carboxílico (por ejemplo, BAKERBOND Carboxy-Sulfon de J.T. Baker); un grupo a base de ácido carboxílico (por ejemplo, WP CBX de J.T Baker, DOWEX MAC-3 de Dow Liquid Separations, Intercambiadores de cationes débiles Amberlite, Intercambiador de cationes débiles DOWEX e intercambiadores de cationes débiles Diaion de Sigma-Aldrich y Fractogel EMD COO- de EMD); un grupo a base de ácido sulfónico (por ejemplo, Hydrocell SP de Biochrom Labs Inc., Resina catiónica de ácido fuerte de malla fina DOWEX de Dow Liquid Separations, UNOsphere S de BioRad, WP Sulfonic de J. T. Baker, Intercambiadores de cationes fuertes Amberlite, Intercambiador de cationes fuertes DOWEX e intercambiador de cationes fuertes Diaion de Sigma-Aldrich); y un grupo a base de ortofosfato (por ejemplo, PI 1 de Whatman). Las resinas de alta capacidad disponibles en el mercado incluyen GigaCap S-650M (Tosoh), Eshmuno™ S (EMD), Nuvia™ S (BioRad), Poros® XS (Applied Biosystems) y Capto S (GE Healthcare). En algunos aspectos de la divulgación, puede usarse una membrana de intercambio catiónico, por ejemplo, Sartobind S (Sartorius; Edgewood, NY), Natrix Adsept™ S (también denominado "Natrix S") y Natri Adsept™ C (también denominado "Natrix C" y Mustang S (Pall). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio catiónico comprende una cromatografía de carboximetilo. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio catiónico comprende una cromatografía de sulfometilo. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de intercambio catiónico comprende una cromatografía de sulfopropilo.

2) Etapa de preequilibrio de II

En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II comprende una etapa de preequilibrio de II que comprende preequilibrar una columna de intercambio iónico con un tampón de preequilibrio de II.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de II es un tampón aniónico. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón aniónico se selecciona del grupo que consiste en tampón de fosfato, tampón de Tris-HCl, tampón de Tricina, tampón Hepes, tampón de glicina, tampón de TEA y tampón de Barbitona sódica. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio es un tampón de fosfato.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de II tiene un pH de aproximadamente 6,0-10,0, 6,5-9,5, 7,0-9,5, 7,0-9,0, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8, 7,4-7,7, 7,5-7,6 o 7,6.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de II (por ejemplo, tampón aniónico, por ejemplo, tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de aniones en un tampón aniónico, por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 1-80 mM, 1-50 mM, 3-40 mM, 5-30 mM, 10-30 mM, 15-25 mM, 18-22 mM o 20 mM.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) comprende además una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es una sal de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preequilibrio de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 220 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preequilibrio de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 1-500 mM, 10-400 mM, 50-300 mM, 100-200 mM, 125-175 mM o 150 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) no comprende una sal (por ejemplo, una sal de sodio, cloruro de sodio).

En algunos aspectos de la divulgación, se aplican a la columna aproximadamente 1-20, 1-10, 1-8, 2-8, 2-6 o 2-5 volúmenes de columna de tampón de preequilibrio.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de II es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de II es un tampón de fosfato que tiene una concentración de iones fosfato de aproximadamente 10-30 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de II es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5 y una concentración de iones fosfato de aproximadamente 10-30 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de fosfato comprende además cloruro de sodio de aproximadamente 100-200 mM (por ejemplo, 150 mM).

En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de preequilibrio de II se realiza a aproximadamente 4-30 °C, 10-25 °C o temperatura ambiente. En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de preequilibrio de II se realiza a aproximadamente 2-8 °C.

3) Etapa de carga de II

Una muestra de virus (por ejemplo, un sobrenadante que contiene virus recogido de un cultivo, por ejemplo, un eluato recogido de una cromatografía en HA) se carga en la columna en la cromatografía de II. En algunos aspectos de la divulgación, la columna se preequilibra antes de la carga de la muestra de virus. En algunos aspectos de la divulgación, la columna no se preequilibra antes de la carga de la muestra de virus. En algunos aspectos de la divulgación, la muestra de virus se pretrata antes de la carga. En algunos aspectos de la divulgación, la muestra de virus se aclara antes de la carga. En algunos aspectos de la divulgación, la muestra de virus se aclara a través de microfiltración antes de cargarla en la columna. En algunos aspectos de la divulgación, la microfiltración comprende filtrar la muestra de virus a través de una membrana con un tamaño de poro de aproximadamente 0,1-1 µm o 1-1,5 µm.

En algunos aspectos de la divulgación, se cargan en la columna de II aproximadamente 1-50, 1-40, 1-30, 1-20 o 5-20 volúmenes de columna de la muestra de virus.

En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de carga de II se realiza a aproximadamente 4-30 °C, 10-25 °C o temperatura ambiente. En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de preequilibrio de II se realiza a aproximadamente 2-8 °C.

4) Etapa de equilibrio de II

En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II comprende una etapa de equilibrio de II que comprende equilibrar una columna de intercambio iónico con un tampón de equilibrio de II.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de II es un tampón aniónico. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón aniónico se selecciona del grupo que consiste en tampón de fosfato, tampón de Tris-HCl, tampón de Tricina, tampón Hepes, tampón de glicina, tampón de TEA y tampón de Barbitona sódica. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado es un tampón de fosfato.

5 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de II es el mismo que el tampón de preequilibrado de II.

10 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene un pH de aproximadamente 6,0-10,0, 6,5-9,5, 7,0-9,5, 7,0-9,0, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8, 7,4-7,7, 7,5-7,6 o 7,6.

15 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 1-50 mM o 1-40 mM, 5-30 mM, 10-30 mM, 15-25 mM, 18-22 mM o 20 mM.

20 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) comprende además una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es una sal de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de equilibrado de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 220 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de equilibrado de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 1-500 mM, 10-400 mM, 50-300 mM, 100-200 mM, 125-175 mM o 150 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) no comprende una sal (por ejemplo, una sal de sodio, cloruro de sodio).

25 En algunos aspectos de la divulgación, se aplican a la columna aproximadamente 1-20, 1-10, 1-8, 2-8, 2-6 o 2-5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado.

30 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de II es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de II es un tampón de fosfato que tiene una concentración de iones fosfato de aproximadamente 10-30 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de II es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5 y una concentración de iones fosfato de aproximadamente 10-30 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de fosfato comprende además cloruro de sodio de aproximadamente 100-200 mM (por ejemplo, 150 mM).

En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de equilibrado de II se realiza a aproximadamente 4-30 °C, 10-25 °C o temperatura ambiente.

40 **5) Etapa de preelución de II**

En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II comprende una etapa de preelución de II que comprende preeluir una columna de intercambio iónico con un tampón de preelución de II.

45 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II es un tampón aniónico. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón aniónico se selecciona del grupo que consiste en tampón de fosfato, tampón de Tris-HCl, tampón de Tricina, tampón Hepes, tampón de glicina, tampón de TEA y tampón de Barbitona sódica. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II es un tampón de fosfato.

50 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II y el tampón de preequilibrado de II/tampón de equilibrado de II comprenden una misma clase de tampón (por ejemplo, tampón de fosfato).

55 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene un pH de aproximadamente 6,0-10,0, 6,5-9,5, 7,0-9,5, 7,0-9,0, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8, 7,4-7,7, 7,5-7,6 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia de pH del tampón de preelución de II y el tampón de preequilibrado de II/tampón de equilibrado de II es inferior a aproximadamente 2, 1, 1,5, 1, 0,8, 0,5, 0,2, 0,1. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II tiene un pH que es el mismo que el del tampón de preequilibrado de II o el tampón de equilibrado de II. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II y el tampón de equilibrado de II/tampón de preequilibrado de II tienen un pH comparable (por ejemplo, la diferencia de pH es inferior a aproximadamente 0,5 o 0,2).

60 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 1-50 mM o 1-40 mM, 5-30 mM, 10-30 mM, 15-25 mM, 18-22 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia de concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de preelución de II y el tampón de preequilibrado de II/tampón de equilibrado de II es inferior a aproximadamente 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM,

5 mM o 2 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) que es la misma que la del tampón de preequilibrado de II o la del tampón de equilibrado de II.

- 5 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) comprende además una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es una sal de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preelución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 1-700 mM, 10-600 mM, 50-500 mM, 100-350 mM, 150-300 mM, 175-275 mM o 250-300 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preelución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 1-300, 10-200, 20-100 mM, 30-80 mM, 40-60 mM, 45-55 mM o 50 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preelución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 1-350 mM, 10-300 mM, 50-200 mM, 70-180 mM, 100-150 mM o 120 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preelución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es al menos aproximadamente 20 mM, 40 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM o 120 mM superior a la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preequilibrado de II o el tampón de equilibrado de II. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preelución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 66 % superior a la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preequilibrado de II o el tampón de equilibrado de II.

En algunos aspectos de la divulgación, se aplican a la columna aproximadamente 1-20, 1-10, 1-8, 2-8, 2-6 o 2-5 volúmenes de columna de tampón de preelución de II.

- 25 En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de preelución de II se realiza a aproximadamente 4-30 °C, 10-25 °C o temperatura ambiente.

- En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II es un tampón de fosfato que tiene una concentración de iones fosfato de aproximadamente 10-30 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5 y una concentración de iones fosfato de aproximadamente 10-30 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de fosfato comprende además cloruro de sodio de aproximadamente 200-300 mM (por ejemplo, 250 mM), 20-100 mM (por ejemplo, 50 mM) o 50-180 mM (por ejemplo, 120 mM).

6) Etapa de elución de II

La cromatografía de II proporcionada en el presente documento comprende una etapa de elución de II que comprende eluir una columna de intercambio iónico con un tampón de elución de II.

- 40 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II es un tampón aniónico. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón aniónico se selecciona del grupo que consiste en tampón de fosfato, tampón de Tris-HCl, tampón de Tricina, tampón Hepes, tampón de glicina, tampón de TEA y tampón de Barbitona sódica. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II es un tampón de fosfato.

- 45 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II y el tampón de preelución de II/tampón de preequilibrado de II/tampón de equilibrado de II comprenden una misma clase de tampón (por ejemplo, tampón de fosfato). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II, el tampón de preelución de II y el tampón de equilibrado de II/el tampón de preequilibrado de II comprenden una misma clase de tampón (por ejemplo, tampón de fosfato).

- 50 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene un pH de aproximadamente 6,0-10,0, 6,5-9,5, 7,0-9,5, 7,0-9,0, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8, 7,4-7,7, 7,5-7,6 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia de pH del tampón de elución de II y el tampón de preelución de II es inferior a aproximadamente 2, 1, 1,5, 1, 0,8, 0,5, 0,2, 0,1. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia de pH del tampón de elución de II y el tampón de preequilibrado de II/tampón de equilibrado de II es inferior a aproximadamente 2, 1, 1,5, 1, 0,8, 0,5, 0,2, 0,1. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene un pH que es el mismo que el del tampón de preelución de II, el tampón de preequilibrado de II o el tampón de equilibrado de II. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II y el tampón de preelución de II tienen un pH comparable (por ejemplo, la diferencia de pH es inferior a aproximadamente 0,5 o 0,2). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II y el tampón de equilibrado de II/tampón de preequilibrado de II tienen un pH comparable (por ejemplo, la diferencia de pH es inferior a aproximadamente 0,5 o 0,2).

- 65 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 1-50 mM o 1-40 mM, 5-30 mM, 10-30 mM, 15-25 mM, 18-22 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia de

concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de elución de II y el tampón de preelución de II es inferior a aproximadamente 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM o 2 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia de la concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de elución de II y el tampón de preequilibrado de II/tampón de equilibrado de II es inferior a

5 aproximadamente 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM o 2 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) que es la misma que la del tampón de preelución de II, el tampón de preequilibrado de II o el tampón de equilibrado de II.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) comprende

10 además una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es una sal de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de elución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 50-1000 mM, 100-800 mM o 200-700 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de elución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 250-

15 750 mM, 300-700 mM, 350-650 mM, 400-600 mM, 450-600 mM o 500-550 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de elución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 100-500 mM, 150-450 mM, 200-400 mM, 250-350 mM, 275-325 mM o 300 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de elución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es al menos aproximadamente 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM

20 o 250 mM superior a la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preelución de II. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de elución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es al menos aproximadamente 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM o 400 mM superior a la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preequilibrado de II o el tampón de equilibrado de II. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal

25 (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de elución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 % o 500 % superior a la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preelución de II. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de elución de II (por ejemplo, un tampón de fosfato) es al menos aproximadamente un 50 %, 100 %, 150 % o 250 % superior

30 a la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preequilibrado de II o el tampón de equilibrado de II.

En algunos aspectos de la divulgación, se aplican a la columna aproximadamente 1-20, 1-10, 1-8, 2-8, 2-6 o 2-5 volúmenes de columna de tampón de elución de II.

35 En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de carga de II se realiza a aproximadamente 4-30 °C, 10-25 °C o temperatura ambiente.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II es un tampón de fosfato que tiene un pH de

40 aproximadamente 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II es un tampón de fosfato que tiene una concentración de iones fosfato de aproximadamente 10-30 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5 y una concentración de iones fosfato de aproximadamente 10-30 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de fosfato comprende además cloruro de sodio de aproximadamente 400-650 mM (por ejemplo, 500-550 mM)

45 o 200-400 mM (por ejemplo, 300 mM).

En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de II comprende más de una etapa de elución de II, y una primera etapa de elución de II comprende eluir la columna de II con un primer tampón de elución de II, y en donde la segunda etapa de elución comprende eluir la columna de II con un segundo tampón de elución de II. En algunos

50 aspectos de la divulgación, el segundo tampón de elución de II y el primer tampón de elución de II son ambos tampón de fosfato y/o tienen un pH igual o comparable (por ejemplo, la diferencia de pH es inferior a aproximadamente 0,5 o 0,2). En algunos aspectos de la divulgación, el primer eluato de II y el segundo eluato de II comprenden respectivamente una primera composición vírica y una segunda composición vírica, y la primera composición vírica y la segunda composición vírica tienen una estructura diferente, pureza o composición de proteína del virus. En algunos

55 aspectos de la divulgación, la primera composición vírica y la segunda composición vírica tienen una pureza diferente (es decir, la relación de proteína vírica con respecto a la proteína total). En algunos aspectos de la divulgación, la primera composición vírica y la segunda composición vírica tienen una composición diferente de la una o más proteínas de membrana externa (por ejemplo, un número de copias diferente de la una o más proteínas de membrana externa, por ejemplo, diferente glicosilación de la una o más proteínas de membrana externa, por ejemplo, relación diferente

60 de la una o más proteínas de membrana externa). En algunos aspectos de la divulgación, la primera composición vírica y la segunda composición vírica tienen un título de virus diferente. En algunos aspectos de la divulgación, la primera composición vírica y la segunda composición vírica tienen una cantidad diferente de ADN y/o proteína no víricos. En algunos aspectos de la divulgación, el ADN y/o proteína no víricos es ADN y/o proteína de la célula hospedadora. En algún aspecto, la proteína no vírica es una albúmina sérica. En algunos aspectos de la divulgación,

65 la albúmina sérica es albúmina sérica bovina.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II, el tampón de equilibrado, el tampón de preelución y/o el tampón de elución comprenden la misma clase de tampón, tienen el mismo pH y diferente concentración de sal. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón es tampón de fosfato.

5 En algunos aspectos de la divulgación, el virus es el virus de la rabia y la cromatografía de II es una cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II y/o tampón de equilibrado de II es un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de preequilibrado de II o tampón de fosfato de equilibrado de II es de aproximadamente 5-50 mM, 10-40 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II y/o el tampón de equilibrado de II tienen un pH de aproximadamente 6,0-9,5, 7,0-9,5, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II y/o el tampón de equilibrado de II comprenden una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II y/o el tampón de equilibrado de II comprenden NaCl aproximadamente 50-300, 100-200, 120-180, 140-160 o 150 mM. En algunos aspectos de la divulgación, se cargan en la columna de II aproximadamente 5-40, 10-30, 15-25 o 20 volúmenes de columna de muestra. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II y/o el tampón de elución de II es un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de preelución de II o el tampón de fosfato de elución de II es de aproximadamente 5-50 mM, 10-40 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II y/o el tampón de elución de II tienen un pH de aproximadamente 6,0-9,5, 7,0-9,5, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II y/o el tampón de elución de II comprenden una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II comprende NaCl aproximadamente 150-500, 200-400, 250-300 o 250 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende NaCl aproximadamente 200-800, 300-700, 400-600, 500-600 o 500-550 mM.

25 En algunos aspectos de la divulgación, el virus es el virus de la encefalitis japonesa y la cromatografía de II es una cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II y/o el tampón de equilibrado de II es un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de preequilibrado de II o el tampón de fosfato de equilibrado de II es de aproximadamente 5-50 mM, 10-40 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II y/o el tampón de equilibrado de II tienen un pH de aproximadamente 6,0-9,5, 7,0-9,5, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II y/o el tampón de equilibrado de II comprenden una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II y/o tampón de equilibrado de II no comprenden una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, se cargan en la columna de II aproximadamente 5-40, 10-30, 15-25 o 20 volúmenes de columna de muestra. En algunos aspectos de la divulgación, se aplican a la columna aproximadamente 1-20, 1-10, 2-8 o 2-5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado después de cargar la muestra. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II y/o tampón de elución de II es un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de preelución de II o el tampón de fosfato de elución de II es de aproximadamente 5-50 mM, 10-40 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II y/o el tampón de elución de II tienen un pH de aproximadamente 6,0-9,5, 7,0-9,5, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II y/o el tampón de elución de II comprenden una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II comprende NaCl aproximadamente 1-250, 20-100, 30-70, 40-60 o 50 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende NaCl aproximadamente 100-500, 200-400, 250-350 o 300 mM.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus es el virus de la gripe y la cromatografía de II es una cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía Capto-DEAE). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II y/o el tampón de equilibrado de II es un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de preequilibrado de II o el tampón de fosfato de equilibrado de II es de aproximadamente 5-50 mM, 10-40 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II y/o el tampón de equilibrado de II tienen un pH de aproximadamente 6,0-9,5, 7,0-9,5, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II y/o el tampón de equilibrado de II comprenden una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de II y/o el tampón de equilibrado de II no comprenden una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, se cargan en la columna de II aproximadamente 5-40, 10-30, 15-25 o 20 volúmenes de columna de muestra. En algunos aspectos de la divulgación, se aplican a la columna aproximadamente 1-20, 1-10, 2-8 o 2-5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado de II después de cargar la muestra. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II y/o el tampón de elución de II es un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de preelución de II o el tampón de fosfato de elución de II es de aproximadamente 5-50 mM, 10-40 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II y/o el tampón de elución de II tienen un pH de aproximadamente 6,0-9,5, 7,0-9,5, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II y/o el tampón de elución de II comprenden una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de II comprende NaCl

aproximadamente 1-400, 50-250, 80-160, 100-150 o 120 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de II comprende NaCl aproximadamente 200-800, 300-700, 400-600, 450-550 o 500 mM.

B. Cromatografía en hidroxiapatita (HA)

Los métodos descritos en el presente documento comprenden una etapa de cromatografía en HA que comprende 1) una etapa de carga de HA que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-II en la columna de hidroxiapatita; y 2) una etapa de elución de HA, que comprende eluir la columna de HA con un tampón de elución de HA. En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden además una etapa de equilibrado de HA, que comprende equilibrar la columna de hidroxiapatita con un tampón de equilibrado de HA; una etapa de preequilibrado de HA, que comprende preequilibrar una columna de hidroxiapatita con un tampón de preequilibrado de hidroxiapatita; y/o una etapa de preelución de HA, que comprende preeluir la columna de hidroxiapatita con un tampón de preelución de HA.

En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden a) una etapa de carga de HA, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-II en la columna de hidroxiapatita; b) una etapa de equilibrado de HA, que comprende equilibrar la columna de hidroxiapatita con un tampón de equilibrado de HA; c) una etapa de elución de HA, que comprende eluir la columna de HA con un tampón de elución de HA. En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden a) una etapa de preequilibrado de HA, que comprende preequilibrar una columna de hidroxiapatita con un tampón de preequilibrado de hidroxiapatita; b) una etapa de carga de HA, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-II en la columna de hidroxiapatita; c) una etapa de equilibrado de HA, que comprende equilibrar la columna de hidroxiapatita con un tampón de equilibrado de HA; d) una etapa de elución de HA, que comprende eluir la columna de HA con un tampón de elución de HA. En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden a) una etapa de preequilibrado de HA, que comprende preequilibrar una columna de hidroxiapatita con un tampón de preequilibrado de hidroxiapatita; b) una etapa de carga de HA, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-II en la columna de hidroxiapatita; c) una etapa de elución de HA, que comprende eluir la columna de HA con un tampón de elución de HA. En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden a) una etapa de carga de HA, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-II en la columna de hidroxiapatita; b) una etapa de equilibrado de HA, que comprende equilibrar la columna de hidroxiapatita con un tampón de equilibrado de HA; c) una etapa de preelución de HA, que comprende preeluir la columna de HA con un tampón de preelución de HA; y d) una etapa de elución de HA, que comprende eluir la columna de HA con un tampón de elución de HA.

En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden a) una etapa de preequilibrado de HA, que comprende preequilibrar una columna de hidroxiapatita con un tampón de preequilibrado de hidroxiapatita; b) una etapa de carga de HA, que comprende cargar la muestra biológica o una muestra de cromatografía post-II en la columna de hidroxiapatita; c) una etapa de equilibrado de HA, que comprende equilibrar la columna de hidroxiapatita con un tampón de equilibrado de HA; d) una etapa de preelución de HA, que comprende preeluir la columna de HA con un tampón de preelución de HA; y e) una etapa de elución de HA, que comprende eluir la columna de HA con un tampón de elución de HA.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus comprende una o más proteínas de membrana externa. Las condiciones de la cromatografía en HA pueden determinarse de acuerdo con uno o más de los siguientes: a) la composición de aminoácidos de la una o más proteínas de membrana externa; b) el número de copias de la una o más proteínas de membrana externa; c) el grado de glicosilación de la una o más proteínas de membrana externa; y d) el grado de fosforilación de la una o más proteínas de membrana externa en la superficie del virus con envoltura. En algunos aspectos de la divulgación, las condiciones de la cromatografía en HA pueden ser una cualquiera o más de las siguientes: el tipo de la columna, la columna específica a usar, las condiciones (por ejemplo, la concentración de iones, el pH, si el tampón específico comprende una sal, el tipo de sal, la concentración de sal y/o el volumen a aplicar) del tampón de preequilibrado, el tampón de equilibrado, el tampón de preelución y/o el tampón de elución, y/o el volumen de la muestra de virus o la cantidad de virus a cargar.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición de aminoácidos de la una o más proteínas de membrana externa comprende la composición de aminoácidos con carga negativa (por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico) en una o más proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, la composición de aminoácidos de la una o más proteínas de membrana externa comprende la composición de aminoácidos con carga positiva (por ejemplo, arginina, histidina y lisina) en la una o más proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, la composición de aminoácidos de la una o más proteínas de membrana externa comprende tanto aminoácidos con carga negativa (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico) en la una o más proteínas de membrana externa, como aminoácidos con carga positiva (por ejemplo, arginina, histidina y lisina) en la una o más proteínas de membrana externa.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición de aminoácidos de la una o más proteínas de membrana externa es la relación en peso de los aminoácidos con carga negativa (por ejemplo, ácido glutámico y ácido aspártico total) en la una o más proteínas de membrana externa con respecto a la una o más proteínas de membrana externa.

5 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución comprende un tampón de fosfato, en donde la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato es proporcional a la relación en peso de los aminoácidos con carga negativa (por ejemplo, ácido glutámico y ácido aspártico total) en la una o más proteínas de membrana externa con respecto a la una o más proteínas de membrana externa.

10 En algunos aspectos de la divulgación, la composición de aminoácidos de la una o más proteínas de membrana externa es la relación en peso de los aminoácidos con carga positiva (por ejemplo, arginina, histidina y lisina total) en la una o más proteínas de membrana externa con respecto a la una o más proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución comprende un tampón de calcio, en donde la concentración de iones calcio en el tampón es proporcional a la relación en peso de los aminoácidos con carga positiva (por ejemplo, arginina, histidina y lisina total) en la una o más proteínas de membrana externa con respecto a la una o más proteínas de membrana externa.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución tiene un tampón de fosfato, y la concentración del ion fosfato es proporcional al grado de la fosforilación de la una o más proteínas de membrana externa.

20 En algunos aspectos de la divulgación, las condiciones de la cromatografía en HA se determinan de acuerdo con el número de copias de la una o más proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de fosfato en el tampón de elución es proporcional al número de copias de la una o más proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, el número de copias de la una o más proteínas de membrana externa es un número de copias promedio de la una o más proteínas de membrana en más de un virus (un lote de virus).

25 En algunos aspectos de la divulgación, el número de copias es un número de copias preferido o un intervalo preferido de número de copias. En algunos aspectos de la divulgación, una vacuna vírica con el preferido o intervalo preferido de número de copias de la una o más proteínas de membrana externa da como resultado inmunogenicidad en un individuo. En algunos aspectos de la divulgación, una vacuna vírica con el número de copias preferido o intervalo preferido de número de copias de la una o más proteínas de membrana externa da como resultado una inmunogenicidad superior en un individuo (por ejemplo, en comparación con una vacuna vírica con un número de copias no preferido de la una o más proteínas de membrana externa).

En algunos aspectos de la divulgación, la una o más proteínas de membrana externa tienen dos números de copias, o dos intervalos de número de copias (es decir, el primer intervalo de número de copias y el segundo intervalo de número de copias) y/o dos grados de glicosilación o dos intervalos de grados de glicosilación (es decir, el primer intervalo de grado de glicosilación y el segundo intervalo de grado de glicosilación). En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía de HA comprende una primera etapa de elución y una segunda etapa de elución, en donde la primera etapa de elución es eluir el primer lote de virus que comprende el primer intervalo de número de copias y/o el primer intervalo de grado de glicosilación, y en donde la segunda etapa de elución es eluir el segundo lote de virus que comprende el segundo intervalo de número de copias y/o el segundo intervalo de grado de glicosilación. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el primer tampón de elución es proporcional al primer intervalo de número de copias de la una o más proteínas de membrana externa e inversamente proporcional al primer intervalo del grado de glicosilación de la una o más proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el segundo tampón de elución es proporcional al segundo intervalo de número de copias de la una o más proteínas de membrana externa e inversamente proporcional al segundo intervalo del grado de glicosilación de la una o más proteínas de membrana externa.

50 Como se ha analizado anteriormente, diferentes números de copias o números de copias preferidos (o intervalo preferido de número de copias) de la una o más proteínas de membrana externa pueden representarse por o convertirse en uno particular (por ejemplo, preferido) o un intervalo particular (por ejemplo, intervalo preferido) del porcentaje relativo de la proteína de membrana externa en la proteína vírica total. El particular (por ejemplo, preferido) o el intervalo particular (por ejemplo, intervalo preferido) del porcentaje relativo de la proteína de membrana externa en la proteína vírica total (por ejemplo, "la relación preferida de proteína de membrana externa") puede ser cualquier porcentaje relativo o cualquier intervalo de porcentajes relativos de la una o más proteínas de membrana externa. De forma similar, un grado particular de glicosilación (por ejemplo, un grado preferido de glicosilación, un intervalo preferido de grado de glicosilación) puede ser cualquier grado o intervalo de grado de glicosilación en la una o más proteínas de membrana externa. La relación particular/preferida de la proteína de membrana externa y el grado particular/preferido de glicosilación pueden determinarse de acuerdo con la finalidad de las partículas víricas. Las finalidades de ejemplo de usar las partículas de virus incluyen la preparación de vacunas y la investigación. En algunos aspectos de la divulgación, el virus que tiene la relación particular/preferida de la proteína de membrana externa tiene mayor potencia que la misma clase de virus que no tiene la relación particular/preferida de la proteína de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, una vacuna con el virus que tiene la relación particular/preferida de la proteína de membrana externa da como resultado una inmunogenicidad superior a la de una vacuna con la misma clase de virus que no tiene la relación particular/preferida de la proteína de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, el virus que tiene el grado de glicosilación particular/preferido en la proteína de membrana externa

tiene mayor potencia que la misma clase de virus que no tiene el grado de glicosilación particular/preferido en la proteína de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, una vacuna con el virus que tiene el grado de glicosilación particular/preferido en la proteína de membrana externa da como resultado una inmunogenicidad superior a la de una vacuna con la misma clase de virus que no tiene el grado de glicosilación particular/preferido en la proteína de membrana externa.

1) Columna de HA

Se encuentran disponibles en el mercado diversas resinas cromatográficas de hidroxiapatita, y puede usarse cualquier forma disponible del material en la práctica de la materia objeto de la presente divulgación. En algunos aspectos de la divulgación, la hidroxiapatita está en forma cristalina. En algunos aspectos de la divulgación, la hidroxiapatita se aglomera para formar partículas y se sinteriza a altas temperaturas hasta obtener una masa cerámica porosa estable.

El tamaño de partícula de la hidroxiapatita puede variar ampliamente. En algunos aspectos de la divulgación, el tamaño de partícula varía de 1 μm a 1000 μm de diámetro, o de 10 μm a 100 μm .

Puede utilizarse cualquier columna de hidroxiapatita adecuada. La hidroxiapatita de ejemplo incluye columnas de hidroxiapatita cerámica (CHT de Tipo I y Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.), columna de hidroxiapatita HA Ultrogel (Pall Corp., East Hills, N.Y.) y columnas de fluorapatita cerámica (CFT de Tipo I y Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.).

En algunos aspectos de la divulgación, la hidroxiapatita está suelta y compactada en una columna. En algunos aspectos de la divulgación, la hidroxiapatita se encuentra en un cromatógrafo anular continuo. En algunos aspectos de la divulgación, la hidroxiapatita es hidroxiapatita cerámica. En algunos aspectos de la divulgación, la hidroxiapatita cerámica se compacta en una columna. En algunos aspectos de la divulgación, para la purificación a pequeña escala se usa un diámetro de columna de al menos 0,5 cm con una altura de lecho de aproximadamente 20 cm. En algunos aspectos de la divulgación, se usa un diámetro de columna de aproximadamente 35 cm a aproximadamente 60 cm. En algunos aspectos de la divulgación, se usa un diámetro de columna de aproximadamente 60 cm a aproximadamente 85 cm. En algunos aspectos de la divulgación, se usa un diámetro de columna de aproximadamente 85 cm a aproximadamente 120 cm (por ejemplo, 100 cm). En algunos aspectos de la divulgación, se usa un diámetro de columna de más de aproximadamente 120 cm.

2) Etapa de preequilibrio de HA

En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en HA comprende una etapa de preequilibrio de HA que comprende preequilibrar una columna de hidroxiapatita con un tampón de preequilibrio de HA.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de HA es un tampón aniónico. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón aniónico se selecciona del grupo que consiste en tampón de fosfato, tampón de Tris-HCl, tampón de Tricina, tampón Hepes, tampón de glicina, tampón de TEA y tampón de Barbitona sódica. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio es un tampón de fosfato.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de HA tiene un pH de aproximadamente 6,0-10,0, 6,5-9,5, 7,0-9,5, 7,0-9,0, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8, 7,4-7,7, 7,5-7,6 o 7,6.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de HA (por ejemplo, tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 1-50 mM o 1-40 mM, 5-30 mM, 10-30 mM, 15-25 mM, 18-22 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de HA (por ejemplo, tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 1-20 mM o 1-10 mM, 2-8 mM, 4-6 mM o 5 mM.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) comprende además una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es una sal de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preequilibrio de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 220 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preequilibrio de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 1-500 mM, 10-400 mM, 50-300 mM, 100-200 mM, 125-175 mM o 150 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preequilibrio de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 100-1000 mM, 300-800 mM, 400-700 mM, 500-600 mM o 550 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrio de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) no comprende una sal (por ejemplo, una sal de sodio, cloruro de sodio).

En algunos aspectos de la divulgación, se aplican a la columna aproximadamente 1-20, 1-10, 1-8, 2-8, 2-6 o 2-5 volúmenes de columna de tampón de preequilibrio.

- En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de HA es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de HA es un tampón de fosfato que tiene una concentración de iones fosfato de aproximadamente 1-50 mM, 10-30 mM, 1-10 mM, 2-8 mM, 4-6 mM, 10 mM-30 mM, 15-25 mM, 5 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de HA es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5 y una concentración de iones fosfato de aproximadamente 10-30 mM, 20 mM, 2-8 mM, 4-6 mM o 5 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de fosfato comprende además cloruro de sodio de aproximadamente 100-200 mM (por ejemplo, 150 mM) o 500-600 (por ejemplo, 550 mM).
- 10 En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de preequilibrado de HA se realiza a aproximadamente 4-30 °C, 10-25 °C o temperatura ambiente.

3) Etapa de carga de HA

- 15 Una muestra de virus (por ejemplo, un sobrenadante que contiene virus recogido de un cultivo, por ejemplo, un eluato recogido de una cromatografía en II) se carga en la columna en la cromatografía de HA. En algunos aspectos de la divulgación, la columna se preequilibra antes de la carga de la muestra de virus. En algunos aspectos de la divulgación, la columna no se preequilibra antes de la carga de la muestra de virus. En algunos aspectos de la divulgación, la muestra de virus se pretrata antes de la carga. En algunos aspectos de la divulgación, la muestra de virus se aclara antes de la carga. En algunos aspectos de la divulgación, la muestra de virus se aclara a través de microfiltración antes de cargarla en la columna. En algunos aspectos de la divulgación, la microfiltración comprende filtrar la muestra de virus a través de una membrana con un tamaño de poro de aproximadamente 0,1-1 µm o 1-1,5 µm.
- 20 En algunos aspectos de la divulgación, se cargan en la columna de HA aproximadamente 1-50, 1-40, 1-30, 1-20 o 5-20 volúmenes de columna de la muestra de virus.

En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de carga de HA se realiza a aproximadamente 4-30 °C, 10-25 °C o temperatura ambiente.

30 4) Etapa de equilibrado de HA

En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en HA comprende una etapa de equilibrado de HA que comprende equilibrar una columna de hidroxiapatita con un tampón de equilibrado de HA.

- 35 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de HA es un tampón aniónico. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón aniónico se selecciona del grupo que consiste en tampón de fosfato, tampón de Tris-HCl, tampón de Tricina, tampón Hepes, tampón de glicina, tampón de TEA y tampón de Barbitona sódica. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado es un tampón de fosfato.
- 40 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de HA es el mismo que el tampón de preequilibrado de HA.
- 45 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene un pH de aproximadamente 6,0-10,0, 6,5-9,5, 7,0-9,5, 7,0-9,0, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8, 7,4-7,7, 7,5-7,6 o 7,6.
- En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de HA (por ejemplo, tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 1-50 mM o 1-40 mM, 5-30 mM, 10-30 mM, 15-25 mM, 18-22 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de HA (por ejemplo, tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 1-20 mM o 1-10 mM, 2-8 mM, 4-6 mM o 5 mM.
- 50

- En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) comprende además una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es una sal de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de equilibrado de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 220 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de equilibrado de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 1-500 mM, 10-400 mM, 50-300 mM, 100-200 mM, 125-175 mM o 150 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de equilibrado de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 100-1000 mM, 300-800 mM, 400-700 mM, 500-600 mM o 550 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) no comprende una sal (por ejemplo, una sal de sodio, cloruro de sodio).
- 55
- 60

- En algunos aspectos de la divulgación, se aplican a la columna aproximadamente 1-20, 1-10, 1-8, 2-8, 2-6 o 2-5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado.
- 65

- En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de HA es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de HA es un tampón de fosfato que tiene una concentración de iones fosfato de aproximadamente 1-50 mM, 10-30 mM, 1-10 mM, 2-8 mM, 4-6 mM, 10 mM-30 mM, 15-25 mM, 5 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de equilibrado de HA es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5 y una concentración de iones fosfato de aproximadamente 10-30 mM, 20 mM, 2-8 mM, 4-6 mM o 5 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de fosfato comprende además cloruro de sodio de aproximadamente 100-200 mM (por ejemplo, 150 mM) o 500-600 (por ejemplo, 550 mM).
- 10 En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de equilibrado de HA se realiza a aproximadamente 4-30 °C, 10-25 °C o temperatura ambiente.

5) Etapa de preelución de HA

- 15 En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en HA comprende una etapa de preelución de HA que comprende preeluir una columna de hidroxiapatita con un tampón de preelución de HA.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA es un tampón aniónico. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón aniónico se selecciona del grupo que consiste en tampón de fosfato, tampón de Tris-HCl, tampón de Tricina, tampón Hepes, tampón de glicina, tampón de TEA y tampón de Barbitona sódica. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA es un tampón de fosfato.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA y el tampón de preequilibrado de HA/tampón de equilibrado de II comprenden una misma clase de tampón (por ejemplo, tampón de fosfato).

25 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene un pH de aproximadamente 6,0-10,0, 6,5-9,5, 7,0-9,5, 7,0-9,0, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8, 7,4-7,7, 7,5-7,6 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia de pH del tampón de preelución de HA y el tampón de preequilibrado de HA/tampón de equilibrado de II es inferior a aproximadamente 2, 1, 1,5, 1, 0,8, 0,5, 0,2, 0,1. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA tiene un pH que es el mismo que el del tampón de preequilibrado de HA o el tampón de equilibrado de HA. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA y el tampón de equilibrado de HA/tampón de preequilibrado de II tienen un pH comparable (por ejemplo, la diferencia de pH es inferior a aproximadamente 0,5 o 0,2).

35 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 1-300 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 1-50 mM o 1-40 mM, 5-30 mM, 10-30 mM, 15-25 mM, 18-22 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 1-20 mM o 1-10 mM, 2-8 mM, 4-6 mM o 5 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 1-200 mM, 20-180 mM, 30-150 mM, 40-120 mM, 50-100 mM, 40-60 mM, 80-120 mM, 50 mM o 100 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de preelución de HA es superior a la concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de preequilibrado de HA/tampón de equilibrado de HA. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia en la concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de preelución de HA y el tampón de preequilibrado de HA/tampón de equilibrado de II es de aproximadamente o inferior a aproximadamente 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM o 2 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia de concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de preelución de HA y el tampón de preequilibrado de HA/tampón de equilibrado de II es de aproximadamente 0,1-100 mM, 20-80 mM, 30-70 mM, 20-40 mM o 70-90 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) que es la misma que la del tampón de preequilibrado de HA o la del tampón de equilibrado de HA. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de preelución de HA es al menos aproximadamente un 50 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 % o 400 % superior a la del tampón de preequilibrado de HA o tampón de equilibrado de HA.

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) comprende además una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es una sal de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preelución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 1-500 mM, 10-400 mM, 50-300 mM, 100-200 mM, 125-175 mM o 150 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia en la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) del tampón de preelución de HA y el tampón de preequilibrado de HA/tampón de equilibrado de II es inferior a 50 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM o 2 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) no comprende una sal

(por ejemplo, una sal de sodio, cloruro de sodio).

En algunos aspectos de la divulgación, se aplican a la columna aproximadamente 1-20, 1-10, 1-8, 2-8, 2-6 o 2-5 volúmenes de columna de tampón de preelución de HA.

5 En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de preelución de HA se realiza a aproximadamente 4-30 °C, 10-25 °C o temperatura ambiente.

10 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA es un tampón de fosfato que tiene una concentración de iones fosfato de aproximadamente 10-30 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA es un tampón de fosfato que tiene una concentración de iones fosfato de aproximadamente 2-8 mM o 5 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA es un
15 tampón de fosfato que tiene una concentración de iones fosfato de aproximadamente 40-120 mM (por ejemplo, 40-60 mM, 80-120 mM), 50-100 mM, 50 mM o 100 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA es un tampón de fosfato que tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,5 y una concentración de iones fosfato de aproximadamente 10-30 mM, 20 mM, 2-8 mM, 5 mM, 40-120 mM (por ejemplo, 40-60 mM, 80-120 mM), 50-100 mM, 50 mM o 100 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de fosfato comprende además cloruro de sodio de aproximadamente 100-200 mM (por ejemplo, 150 mM), o no comprende cloruro de sodio.

20 6) Etapa de elución de HA

La cromatografía en HA proporcionada en el presente documento comprende una etapa de elución de HA que comprende eluir una columna de hidroxiapatita con un tampón de elución de HA.

25 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA es un tampón aniónico. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón aniónico se selecciona del grupo que consiste en tampón de fosfato, tampón de Tris-HCl, tampón de Tricina, tampón Hepes, tampón de glicina, tampón de TEA y tampón de Barbitona sódica. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA es un tampón de fosfato.

30 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA y el tampón de preelución de HA/tampón de preequilibrado de II/tampón de equilibrado de II comprenden una misma clase de tampón (por ejemplo, tampón de fosfato). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA, el tampón de preelución de HA y el tampón de equilibrado de HA/el tampón de preequilibrado de HA comprenden una misma clase de tampón (por
35 ejemplo, tampón de fosfato).

En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene un pH de aproximadamente 6,0-10,0, 6,5-9,5, 7,0-9,5, 7,0-9,0, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8, 7,4-7,7, 7,5-7,6 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia de pH del tampón de elución de HA y el tampón de preelución de HA es inferior a aproximadamente 2, 1, 1,5, 1, 0,8, 0,5, 0,2, 0,1. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia de pH del tampón de elución de HA y el tampón de preequilibrado de HA/tampón de equilibrado de II es inferior a aproximadamente 2, 1, 1,5, 1, 0,8, 0,5, 0,2, 0,1. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA tiene un pH que es el mismo que el del tampón de preelución de HA, el tampón de preequilibrado de HA o el tampón de equilibrado de HA. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA y el tampón de preelución de HA tienen un pH comparable (por ejemplo, la diferencia de pH es inferior a aproximadamente 0,5 o 0,2). En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA y el tampón de equilibrado de HA/tampón de preequilibrado de II tienen un pH comparable (por ejemplo, la diferencia de pH es inferior a aproximadamente 0,5 o 0,2).

50 En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 50-500 mM, 75-350 mM, 80-320 mM, 90-310 mM, 100-300 mM, 80-120 mM, 150-250 mM, 180-220 mM, 250-350 mM, 280-380 mM, 75-225 mM, 100 mM, 200 mM o 300 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 200 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA (por ejemplo, un
55 tampón de fosfato) tiene una concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) de aproximadamente 100-200 mM, 125-175 mM o 150 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de elución de HA es superior a la concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de preelución de HA o el tampón de preequilibrado de HA/tampón de equilibrado de HA. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia en la concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de elución de HA y el tampón de preelución de HA es de aproximadamente o al menos aproximadamente 10-400 mM, 30-300 mM, 50-250 mM, 120-180 mM, 150-200 mM, 100 mM, 150 mM o 180 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia en la concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de elución de HA y el tampón de preequilibrado de HA/tampón de equilibrado de II es de aproximadamente o al menos aproximadamente 50-500 mM, 70-300 mM, 80-280 mM, 100-200 mM, 140-180 mM, 145 mM o 180 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones (por
65 ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de elución de HA es al menos aproximadamente 1,5 veces, 2

- veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces o 30 veces la concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de preelución de HA. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de elución de HA es al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces o 30 veces la concentración de iones (por ejemplo, concentración de iones fosfato) del tampón de preequilibrado de HA/tampón de equilibrado de II.
- En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de elución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) comprende además una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es una sal de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de elución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) es de aproximadamente 1-500 mM, 10-400 mM, 50-300 mM, 100-200 mM, 125-175 mM o 150 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la diferencia en la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) del tampón de elución de HA y el tampón de preelución de HA es inferior a 50 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM o 2 mM. En algún aspecto, la diferencia en la concentración de la sal (por ejemplo, cloruro de sodio) del tampón de elución de HA y el tampón de preequilibrado de HA/tampón de equilibrado de II es inferior a 50 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM o 2 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA (por ejemplo, un tampón de fosfato) no comprende una sal (por ejemplo, una sal de sodio, cloruro de sodio).
- En algunos aspectos de la divulgación, se aplican a la columna aproximadamente 1-20, 1-10, 1-8, 2-8, 2-6 o 2-5 volúmenes de columna de tampón de elución de HA.
- En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de elución de HA se realiza a aproximadamente 4-30 °C, 10-25 °C o temperatura ambiente.
- En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución y el tampón de elución comprenden un mismo tampón. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución y el tampón de elución tienen una diferencia de pH inferior a aproximadamente 2, 1,5, 1, 0,8, 0,5 o 0,2. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución y el tampón de elución tienen un pH comparable (por ejemplo, la diferencia de pH es inferior a 0,5).
- En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA y el tampón de elución de HA comprenden ambos una sal. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución de HA y el tampón de elución de HA tienen la misma sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es una sal de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, la sal en el tampón de preelución de HA tiene la misma concentración de sal que la sal en el tampón de elución de HA. En algunos aspectos de la divulgación, la sal de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) en el tampón de preelución tiene una concentración mayor o menor que en el tampón de elución.
- En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en HA comprende más de una etapa de elución, en donde una primera etapa de elución comprende eluir la columna de HA con un primer tampón de elución, y en donde la segunda etapa de elución comprende eluir la columna de HA con un segundo tampón de elución. En algunos aspectos de la divulgación, el segundo tampón de elución y el primer tampón de elución son ambos tampón de fosfato y/o tienen el mismo pH. En algunos aspectos de la divulgación, el primer eluato y el segundo eluato comprenden respectivamente una primera composición vírica y una segunda composición vírica, en donde la primera composición vírica y la segunda composición vírica tienen una estructura diferente, pureza o composición de proteína del virus. En algunos aspectos de la divulgación, la primera composición vírica y la segunda composición vírica tienen una pureza diferente (por ejemplo, la relación de proteína vírica con respecto a la proteína total). En algunos aspectos de la divulgación, la primera composición vírica y la segunda composición vírica tienen una composición diferente de la una o más proteínas de membrana externa (por ejemplo, un número de copias diferente de la una o más proteínas de membrana externa, por ejemplo, diferente glicosilación de la una o más proteínas de membrana externa, por ejemplo, relación diferente de la una o más proteínas de membrana externa). En algunos aspectos de la divulgación, la primera composición vírica y la segunda composición vírica tienen un título de virus diferente. En algunos aspectos de la divulgación, la primera composición vírica y la segunda composición vírica tienen una cantidad diferente de ADN y/o proteína no víricos. En algunos aspectos de la divulgación, el ADN y/o proteína no víricos es ADN y/o proteína de la célula hospedadora. En algún aspecto, la proteína no vírica es una albúmina sérica. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina sérica es albúmina sérica bovina.
- En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado de HA, el tampón de equilibrado de HA, el tampón de preelución de HA y/o el tampón de elución de HA son la misma clase de tampón y/o tienen el mismo pH. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón es tampón de fosfato.
- En algunos aspectos de la divulgación, el virus es el virus de la rabia. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en HA es una cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado y/o tampón de equilibrado es un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de preequilibrado o tampón de fosfato de equilibrado es de aproximadamente 5-50 mM, 10-40 mM, 10-30 mM, 15-25 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado y/o tampón de equilibrado tienen un pH de aproximadamente 6,0-9,5, 7,0-9,5, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8 o 7,6. En algunos

aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado y/o tampón de equilibrado comprenden una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado y/o tampón de equilibrado comprenden NaCl aproximadamente 50-300, 100-200, 120-180, 140-160 o 150 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado y/o tampón de equilibrado comprenden NaCl aproximadamente 200-800, 300-700, 400-650, 500-600 o 550 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado y/o tampón de equilibrado no comprenden una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, se cargan en la columna de HA aproximadamente 5-40, 10-30, 15-25 o 20 volúmenes de columna de muestra. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución y/o tampón de elución es un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de preelución o tampón de fosfato de elución es de aproximadamente 20-100 mM, 30-70 mM, 40-60 mM o 50 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de elución o tampón de fosfato de elución es de aproximadamente 100-300, 125-275, 150-250, 175-225 o 200 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución y/o el tampón de elución tienen un pH de aproximadamente 6,0-9,5, 7,0-9,5, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución y/o el tampón de elución comprenden una sal. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es cloruro de sodio. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución o el tampón de elución comprende NaCl aproximadamente 50-300, 100-200, 125-175 o 150 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución o el tampón de elución no comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio).

En algunos aspectos de la divulgación, el virus es el virus de la encefalitis japonesa. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en HA es una cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado y/o tampón de equilibrado es un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de preequilibrado o tampón de fosfato de equilibrado es de aproximadamente 0-20 mM, 1-15 mM, 1-10 mM, 3-8 mM, 4-7 mM o 5 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado y/o tampón de equilibrado tienen un pH de aproximadamente 6,0-9,5, 7,0-9,5, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado y/o tampón de equilibrado no comprenden una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, se cargan en la columna de HA aproximadamente 5-40, 10-30, 15-25 o 20 volúmenes de columna de muestra. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución y/o tampón de elución es un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de preelución o tampón de fosfato de elución es de aproximadamente 0-20 mM, 1-15 mM, 1-10 mM, 3-8 mM, 4-7 mM o 5 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de elución o tampón de fosfato de elución es de aproximadamente 50-300, 100-200, 125-175 o 150 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución y/o el tampón de elución tienen un pH de aproximadamente 6,0-9,5, 7,0-9,5, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución o el tampón de elución no comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio).

En algunos aspectos de la divulgación, el virus es el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, la cromatografía en HA es una cromatografía CHT. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado y/o tampón de equilibrado es un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de preequilibrado o tampón de fosfato de equilibrado es de aproximadamente 5-50 mM, 10-40 mM, 10-30 mM, 15-25 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado y/o tampón de equilibrado tienen un pH de aproximadamente 6,0-9,5, 7,0-9,5, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preequilibrado y/o tampón de equilibrado no comprenden una sal (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunos aspectos de la divulgación, se cargan en la columna de HA aproximadamente 5-40, 10-30, 15-25 o 20 volúmenes de columna de muestra. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución y/o tampón de elución es un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de preelución o tampón de fosfato de elución es de aproximadamente 5-50 mM, 10-40 mM, 10-30 mM, 15-25 mM o 20 mM. En algunos aspectos de la divulgación, la concentración de iones fosfato en el tampón de fosfato de elución o tampón de fosfato de elución es de aproximadamente 100-300, 125-275, 150-250, 175-225 o 200 mM. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución y/o el tampón de elución tienen un pH de aproximadamente 6,0-9,5, 7,0-9,5, 7,0-8,5, 7,0-8,0, 7,2-7,8 o 7,6. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de preelución o el tampón de elución no comprende una sal (por ejemplo, cloruro de sodio).

55 C. Inactivación del virus

En algunos aspectos de la divulgación, el método comprende además una etapa de inactivación del virus. En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de inactivación del virus se realiza antes de la cromatografía de II, la cromatografía en HA, o ambas. En algunos aspectos de la divulgación, la inactivación del virus se realiza después de la cromatografía de II, la cromatografía en HA, o ambas.

En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de inactivación comprende poner en contacto el virus con un agente de inactivación. En algunos aspectos de la divulgación, el agente de inactivación altera una estructura espacial de la una o más proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, el agente de inactivación altera el genoma del virus o la estructura del genoma vírico. La inactivación vírica puede realizarse por medio de agentes químicos bien conocidos por el experto en la materia, tal como formaldehído, glutaraldehído o β -propiolactona.

También es posible usar el método de inactivación como se describe en el documento WO 2005/093049, que consiste en poner la solución vírica purificada en contacto con un compuesto hidrófobo fotoactivable y en exponer esta mezcla a la luz. Entre los compuestos hidrófobos fotoactivables, se hace mención al azidobenceno, 1-azidonaftaleno, 4-azido-2-nitro-1-(feniltio)benceno, 1-azido-4-yodobenceno, 1-azido-5-yodonaftaleno, 3-fenil-3H-diazireno, 3-fenil-3-(trifluorometil)-3H-diazireno, 3-(3-yodofenil)-3-(trifluorometil)-3H-diazireno, 1-azidopireno, adamantino diazireno, ácido 12-(4-azido-2-nitrofenoxi)esteárico, ácido w-(m-diazirinofenoxi) graso, ácido 12-[(azidocarbonil)oxi]esteárico, ácido 12-azidoesteárico, ácido 11-(3-azidofenoxi)undecanoico o ácido w-(m-diazirinofenoxi)undecanoico o 1,5-yodonafitil azida.

En algunos aspectos de la divulgación, se usa β -propiolactona (BPL). En algunos aspectos de la divulgación, la inactivación del virus se realiza por medio de una solución de β -propiolactona diluida a entre 1/1000-1/10000, 1/2000-1/8000, 1/3000-1/6000 o 1/3500-1/4000 (concentración en volumen final en la solución que contiene el virus purificado).

En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de inactivación se realiza a una temperatura de aproximadamente 5-25 °C, 10-15 °C o 12 °C. En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de inactivación se realiza a una temperatura de entre 20-37 °C. En algunos aspectos de la divulgación, la inactivación del virus se realiza en un período de tiempo que varía entre aproximadamente 4-72 horas, 6-60 horas o 12-48 horas.

En algunos aspectos de la divulgación, la β -propiolactona se hidroliza. En algunos aspectos de la divulgación, la β -propiolactona se hidroliza calentando la solución a una temperatura de aproximadamente 25-40 °C, 30-40 °C, 35-40 °C o 37 °C durante 0,5-8 horas, 1-6 horas, 2-4 horas o 2 horas. En algunos aspectos de la divulgación, el pH de la solución de virus inmediatamente antes o durante el tratamiento con β -propiolactona es de al menos 7 o 7,5.

D. Aclarado

En algunos aspectos de la divulgación, la muestra biológica se somete a una etapa de aclarado. En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de aclarado se realiza antes de la cromatografía de II, cromatografía en HA o ambas. En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de aclarado se realiza después de la cromatografía de II, cromatografía en HA o ambas.

En algunos aspectos de la divulgación, la etapa de aclarado comprende la microfiltración a través de un microfiltro. En algunos aspectos de la divulgación, el microfiltro tiene un tamaño de poro de aproximadamente o al menos aproximadamente 0,1 μ m, 0,2 μ m, 0,3 μ m, 0,4 μ m, 0,5 μ m, 0,6 μ m, 0,7 μ m, 0,8 μ m, 0,9 μ m, 1,0 μ m, 1,1 μ m, 1,2 μ m, 1,3 μ m, 1,4 μ m, 1,5 μ m, 1,6 μ m, 1,7 μ m, 1,8 μ m, 1,9 μ m, 2,0 μ m. En algunos aspectos de la divulgación, el microfiltro tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,1-2,0 μ m, 0,25-2,0 μ m, 0,5-2,0 μ m, 0,75-2,0 μ m, 1,0-2,0 μ m, 1,25-2,0 μ m, 1,5-2,0 μ m, 1,75-2,0 μ m, 0,1-1,75 μ m, 0,25-1,75 μ m, 0,5-1,75 μ m, 0,75-1,75 μ m, 1,0-1,75 μ m, 1,25-1,75 μ m, 1,5-1,75 μ m, 0,1-1,5 μ m, 0,25-1,5 μ m, 0,5-1,5 μ m, 0,75-1,5 μ m, 1,0-1,5 μ m, 1,25-1,5 μ m, 0,1-1,25 μ m, 0,25-1,25 μ m, 0,5-1,25 μ m, 0,75-1,25 μ m, 1,0-1,25 μ m, 0,1-1,0 μ m, 0,25-1,0 μ m, 0,5-1,0 μ m, 0,75-1,0 μ m, 0,1-0,75 μ m, 0,25-0,75 μ m, 0,5-0,75 μ m, 0,1-0,5 μ m, 0,25-0,5 μ m o 0,1-0,25 μ m. En algunos aspectos de la divulgación, el microfiltro tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,45 μ m. En algunos aspectos de la divulgación, el microfiltro tiene un tamaño de poro de aproximadamente 1,2 μ m. En algunos aspectos de la divulgación, el microfiltro tiene un tamaño de poro, en donde al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % del virus que pasa a través del microfiltro permanece intacto. La integridad del virus puede evaluarse observando el virus bajo microscopía electrónica, evaluando el título de virus o cualquier otro método conocido en la técnica. En algunos aspectos de la divulgación, el título de virus después de la microfiltración es de al menos aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % del título de virus antes de la microfiltración.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus no se somete a una etapa de centrifugación antes de someterlo a la cromatografía de II y/o la cromatografía en HA. En algunos aspectos de la divulgación, el virus no se somete a una etapa de ultracentrifugación antes de someterlo a la cromatografía de II y/o la cromatografía en HA. En algunos aspectos de la divulgación, el virus no se somete a una etapa de centrifugación antes de someterlo a la cromatografía de II y/o la cromatografía en HA. En algunos aspectos de la divulgación, el virus no se somete a una etapa de filtración en gel antes de someterlo a la cromatografía de II y/o la cromatografía en HA. En algunos aspectos de la divulgación, el virus no se somete a una etapa de filtración a través de un filtro, en donde el filtro tiene un tamaño de poro de aproximadamente o menos de aproximadamente 1,2 μ m, 1,1 μ m, 1,0 μ m, 0,9 μ m, 0,8 μ m, 0,7 μ m, 0,6 μ m, 0,5 μ m, 0,45 μ m, 0,4 μ m, 0,3 μ m, 0,2 μ m, 0,1 μ m, 0,75 μ m, 0,05 μ m, 0,25 μ m o 0,01 μ m. En algunos aspectos de la divulgación, el virus no se somete a una etapa de filtración (por ejemplo, ultrafiltración) o centrifugación (por ejemplo, ultracentrifugación) antes de someterlo a la cromatografía de II y/o la cromatografía en HA, en donde al menos el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % del virus pierde su integridad. La integridad del virus puede evaluarse observando el virus bajo microscopía electrónica, evaluando el título de virus o cualquier otro método conocido en la técnica. En algunos aspectos de la divulgación, el título de virus después de la filtración (por ejemplo, ultrafiltración) o centrifugación (por ejemplo, ultracentrifugación) es de aproximadamente o menos de aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % del título de virus antes de la microfiltración.

E. Virus

El virus descrito en la presente divulgación puede ser cualquier virus con envoltura. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se selecciona del grupo que consiste en el virus de la rabia, el virus de la gripe, el virus de la encefalitis japonesa, el virus del sarampión, el virus de la rubeola, el virus de la varicela, el virus de las paperas, el virus del dengue o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

En algunos aspectos de la divulgación, la cepa del virus está atenuada. En algunos aspectos de la divulgación, la cepa del virus no está atenuada.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus es el virus de la rabia. En algunos aspectos de la divulgación, la cepa del virus es CTN-1V. En algunos aspectos de la divulgación, el virus es el virus de la encefalitis japonesa. En algunos aspectos de la divulgación, la cepa del virus es P3. En algunos aspectos de la divulgación, el virus es el virus de la gripe. En algunos aspectos de la divulgación, la cepa del virus es H1N1.

1) Partículas de virus purificadas

En el presente documento también se proporcionan virus aislados producidos mediante los métodos descritos en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado comprende una o más proteínas de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, la una o más proteínas de membrana externa tienen un número de copias preferido o un intervalo preferido de número de copias. En algunos aspectos de la divulgación, el número de copias preferido o el intervalo preferido de número de copias es superior a un número de copias o intervalo de número de copias no preferido. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado con el número de copias preferido o el intervalo preferido de número de copias de la proteína de membrana externa tiene una mayor estabilidad que el virus con un número de copias no preferido de la proteína de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, una vacuna vírica con el virus purificado con el número de copias preferido o el intervalo preferido de número de copias es más inmunogénica que una vacuna vírica con un virus con el número de copias o intervalo de número de copias no preferido en la proteína de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, el número de copias preferido es de al menos aproximadamente 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000. En algunos aspectos de la divulgación, el intervalo preferido de número de copias es de aproximadamente 20-50, 50-100, 100-150, 150-200, 250-300, 350-400, 450-500, 500-600, 600-700, 700-800, 800-900, 900-1000 o más de 1000.

En algunos aspectos de la divulgación, la una o más de una proteína de membrana externa comprende una glicoproteína. En algunos aspectos de la divulgación, la glicoproteína tiene un grado preferido o intervalo preferido de grado de glicosilación. En algunos aspectos de la divulgación, el grado preferido o intervalo preferido de grados de glicosilación es superior a un grado o intervalo no preferido de grados de glicosilación. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado con un grado preferido de glicosilación en la una o más proteínas de membrana externa tiene una mayor estabilidad que el virus con un grado no preferido de glicosilación en la una o más de una proteína de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, una vacuna vírica con el virus purificado con un grado preferido de glicosilación en la una o más proteínas de membrana externa es más inmunogénica que una vacuna vírica con un virus con un grado no preferido de glicosilación en la una o más de una proteína de membrana externa.

En algunos aspectos de la divulgación, la una o más proteínas de membrana externa comprenden una glicoproteína que comprende oligosacárido, en donde la relación en peso de oligosacárido con respecto a la glicoproteína completa es de aproximadamente o al menos aproximadamente el 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 por ciento. En algunos aspectos de la divulgación, siendo la relación en peso de oligosacárido con respecto a la glicoproteína completa de aproximadamente el 5-20, 10-18 o 12-15 por ciento.

En algunos aspectos de la divulgación, la una o más proteínas de membrana externa tienen una relación en peso de aproximadamente o al menos aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o el 90 por ciento con respecto a la proteína vírica total. En algunos aspectos de la divulgación, la una o más proteínas de membrana externa tienen una relación en peso de aproximadamente el 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-45, 45-50, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-75, 75-80, 80-85 u 85-90 por ciento con respecto a la proteína vírica total.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado comprende una proteína no de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, la relación en peso de la proteína no de membrana externa a la proteína vírica total es de aproximadamente o al menos aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 por ciento. En algunos aspectos de la divulgación, la relación en peso de la proteína con respecto a la proteína vírica total es inferior a aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 por ciento. En algunos aspectos de la divulgación, la relación en peso de la proteína con respecto a la proteína vírica total es de aproximadamente el 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-45, 45-50, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-75, 75-80, 80-85 u 85-90 por ciento.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado es el virus de la rabia que comprende una proteína G de membrana externa. En algunos aspectos de la divulgación, la relación en peso de proteína G con respecto a la proteína vírica total es de al menos aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 45 por ciento. En algunos aspectos de la divulgación,

la relación en peso de proteína G con respecto a la proteína vírica total es de aproximadamente el 25-70 %, 30-60 %, 35-55 % o 35-48 %.

En algunos aspectos de la divulgación, al menos aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 % o 95 % del virus purificado en la composición son partículas intactas. La integridad de las partículas de virus purificadas puede determinarse por el tamaño, la forma, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH), las características biofísicas o bioquímicas (por ejemplo, la glicosilación de proteínas de membrana externa).

La integridad puede determinarse observando el aspecto (por ejemplo, tamaño o forma) de las partículas de virus. El tamaño o la forma de las partículas puede analizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por medio de microscopía electrónica o la máquina zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), que mide el movimiento browniano de las partículas basándose en la dispersión de luz "caselástica" (dispersión de luz dinámica).

En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado está esencialmente exento de ADN no vírico. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado está esencialmente exento de ADN de las células hospedadoras. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado tiene menos de aproximadamente 100 pg, 80 pg, 60 pg, 40 pg o 20 pg de ADN no vírico o ADN de células hospedadoras por dosis. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado tiene menos de aproximadamente 100 pg, 80 pg, 60 pg, 40 pg o 20 pg de ADN no vírico o ADN de células hospedadoras por dosis, en donde cada dosis tiene una potencia de al menos 2,5 UI (ensayo de NIH). En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado tiene menos de aproximadamente 100 pg, 80 pg, 60 pg, 40 pg, 20 pg o 10 pg de ADN no vírico o ADN de células hospedadoras por cada 50 µg. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado tiene aproximadamente o menos de aproximadamente el 1 %, 0,5 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 % o 0,08 % de ADN de células hospedadoras.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado está esencialmente exento de proteína no vírica. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado está esencialmente exento de proteína de células hospedadoras. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado comprende aproximadamente o menos de aproximadamente 4 µg, 3 µg, 2 µg, 1 µg, 0,8 µg, 0,7 µg, 0,6 µg o 0,5 µg de proteína no vírica o proteína de células hospedadoras por dosis. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado comprende aproximadamente o menos de aproximadamente 4 µg, 3 µg, 2 µg, 1 µg, 0,8 µg, 0,7 µg, 0,6 µg o 0,5 µg de proteína no vírica o proteína de células hospedadoras por dosis, en donde cada dosis tiene una potencia de al menos 2,5 UI (ensayo de NIH). En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado comprende aproximadamente o menos de aproximadamente 4 µg, 3 µg, 2 µg, 1 µg, 0,8 µg, 0,7 µg, 0,6 µg o 0,5 µg de proteína no vírica o proteína de células hospedadoras por cada 50 µg. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado tiene aproximadamente o menos de aproximadamente el 50 %, 35 %, 20 %, 10 %, 8 %, 5 %, 4 % o 3 % de proteínas de células hospedadoras.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado está esencialmente exento de una albúmina sérica. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina sérica es de origen animal. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina sérica es de origen humano. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina sérica es de origen bovino. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina sérica es albúmina sérica bovina fetal. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina sérica es albúmina sérica de ternera. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado comprende aproximadamente o menos de aproximadamente 50 ng, 40 ng, 30 ng, 20 ng, 10 ng, 8 ng, 6 ng, 5 ng, 4 ng, 3 ng, 2 ng o 1 ng de la albúmina sérica por dosis. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina sérica es albúmina sérica de ternera. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado comprende aproximadamente o menos de aproximadamente 50 ng, 40 ng, 30 ng, 20 ng, 10 ng, 8 ng, 6 ng, 5 ng, 4 ng, 3 ng, 2 ng o 1 ng de la albúmina sérica en cada dosis, en donde cada dosis tiene una potencia de al menos 2,5 UI (ensayo de NIH). En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado comprende aproximadamente o menos de aproximadamente 50 ng, 40 ng, 30 ng, 20 ng, 10 ng, 8 ng, 6 ng, 5 ng, 4 ng, 3 ng, 2 ng o 1 ng de la albúmina sérica por cada 50 µg. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado tiene aproximadamente o menos de aproximadamente el 0,1 %, 0,075 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,01 %, 0,008 % o 0,006 % de albúmina sérica.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado tiene un pH de aproximadamente 7,2-8,0, 7,4-7,8, 7,5-7,7 o 7,6-7,7. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado tiene una osmolalidad de aproximadamente 300-450, 350-400 o 370-390 mOsmol/kg.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de aproximadamente o al menos aproximadamente 2,5 UI, 3 UI, 3,5 UI, 4 UI, 4,5 UI o 5 UI por dosis o por cada 25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado está en una solución, en donde la solución es transparente. En algunos aspectos de la divulgación, la solución es un tampón de fosfato.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado es estable durante o al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses a temperatura ambiente (por ejemplo, a aproximadamente 20-25 °C) o en condiciones de refrigeración (por ejemplo, a aproximadamente 2-8 °C). En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado es estable durante al menos aproximadamente 14, 28, 31, 35, 39 o 42 días a aproximadamente 35-40 °C (por ejemplo, 37 °C). El virus purificado es estable cuando la composición tiene aproximadamente o al menos aproximadamente 2,5 UI, 3 UI, 3,5 UI, 4 UI, 4,5 UI o 5 UI por dosis o por cada 25 µg después de mantenerla durante dicho período de

tiempo en dichas condiciones o temperatura. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de aproximadamente o al menos aproximadamente 3 UI, 3,5 UI, 4 UI, 4,5 UI, 5 UI, 5,5 UI, 6 UI, 6,6 UI, 7 UI, 7,5 UI, 8 UI, 8,5 UI por dosis o por cada 25 µg después de mantenerla durante dicho período de tiempo en dichas condiciones o temperatura. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado después de mantenerlo durante más de 3 meses (por ejemplo, aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses) a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) que no disminuye en más de aproximadamente el 2,5 %, 5 %, 10 %, 15 % o 20 % en comparación con la potencia después de mantenerlo durante 3 meses en dichas condiciones. En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado después de mantenerlo durante más de 28 días a aproximadamente 35-40 °C (por ejemplo, 37 °C) tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) que no disminuye en más de aproximadamente el 2,5 %, 5 %, 10 %, 15 % o 20 % en comparación con la potencia después de mantenerlo durante 28 días en dichas condiciones.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de aproximadamente o al menos aproximadamente 2,5 UI, 2,6 UI, 2,7 UI, 2,8 UI, 2,9 UI, 3 UI, 3,1 UI, 3,2 UI, 3,3 UI por dosis o por cada 25 µg en ensayo de estabilidad térmica. El ensayo de estabilidad se realiza manteniendo la composición a una temperatura alta (por ejemplo, una temperatura superior a la temperatura ambiente, por ejemplo, superior a aproximadamente 30 °C, por ejemplo, aproximadamente 35-40 °C, por ejemplo, aproximadamente 37 °C) durante un período de tiempo (por ejemplo, aproximadamente o al menos aproximadamente 14, 28, 31, 35, 39 o 42 días), y evaluando la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición después dicho periodo de tiempo.

En algunos aspectos de la divulgación, las purezas del virus purificado de dos lotes diferentes de las muestras biológicas no difieren en más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 15 % o 20 %. En algunos aspectos de la divulgación, la pureza del virus purificado es la relación de la proteína vírica con respecto a la proteína total. En algunos aspectos de la divulgación, las purezas del virus purificado de múltiples lotes de las muestras biológicas son no inferiores al 80 %, 85 %, 90 %, 92,5 % o 95 %.

En algunos aspectos de la divulgación, las relaciones de la una o más proteínas de membrana externa con respecto a la proteína vírica total del virus purificado de dos lotes diferentes de muestras biológicas no difieren en más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %. En algunos aspectos de la divulgación, el número de copias de la una o más proteínas de membrana externa del virus purificado de dos lotes diferentes de muestras biológicas no difieren en más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %. En algunos aspectos de la divulgación, los grados de glicosilación (por ejemplo, la relación de oligosacáridos con respecto a la proteína o proteínas de membrana externa) de la una o más proteínas de membrana externa en el virus purificado de dos lotes diferentes de las muestras biológicas no difieren en más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %.

En algunos aspectos de la divulgación, las potencias (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus purificado de múltiples lotes de muestras biológicas no difieren en más de aproximadamente el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % por dosis o 25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, las potencias (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus purificado de múltiples lotes de muestras biológicas no difieren en más de aproximadamente 0,5 UI, 1 UI, 1,5 UI, 2 UI, 2,5 UI, 3 UI, 4 UI o 5 UI por dosis o 25 µg.

En algunos aspectos de la divulgación, los múltiples lotes comprenden aproximadamente o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5 lotes. En algunos aspectos de la divulgación, los dos o múltiples lotes diferentes de muestras biológicas derivan de inocular el mismo tipo de células o tejidos. En algunos aspectos de la divulgación, los dos o múltiples lotes diferentes de muestras biológicas derivan de inocular un tipo diferente de células o tejidos. En algunos aspectos de la divulgación, los dos o múltiples lotes diferentes de muestras biológicas derivan de inocular las mismas células o tejidos. En algunos aspectos de la divulgación, los dos o múltiples lotes diferentes de muestras biológicas derivan de inocular las mismas células o tejidos.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus purificado es para preparar una vacuna.

F. Recogida de virus

En algunos aspectos de la divulgación, la muestra biológica deriva de un cultivo que recoge un virus. En algunos aspectos de la divulgación, el cultivo es un cultivo celular. En algunos aspectos de la divulgación, el cultivo es un cultivo tisular. En algunos aspectos de la divulgación, el tejido es un tejido animal. En algunos aspectos de la divulgación, el tejido es un tejido aviar. En algunos aspectos de la divulgación, el tejido es un tejido cerebral. En algunos aspectos de la divulgación, el tejido cerebral es de un ratón. En algunos aspectos de la divulgación, el cultivo es un cultivo de embriones no humanos. En algunos aspectos de la divulgación, el embrión es un embrión de ave. En algunos aspectos de la divulgación, el embrión es un embrión de pollo. En algunos aspectos de la divulgación, el embrión es un embrión de pato.

En algunos aspectos de la divulgación, el cultivo es un cultivo de células primarias. En algunos aspectos de la divulgación, el cultivo es un cultivo de células con pases. En algunos aspectos de la divulgación, las células son células

animales. En algunos aspectos de la divulgación, las células son células humanas. En algunos aspectos de la divulgación, las células son células diploides humanas. En algunos aspectos de la divulgación, las células son células MRC-5. En algunos aspectos de la divulgación, las células son células Vero. En algunos aspectos de la divulgación, las células son células primarias de hámster. En algunos aspectos de la divulgación, las células son células de riñón. En algunos aspectos de la divulgación, las células son células primarias de riñón de hámster. En algunos aspectos de la divulgación, las células son células de riñón de perro. En algunos aspectos de la divulgación, las células son células primarias de riñón de perro. En algunos aspectos de la divulgación, las células son fibroblastos. En algunos aspectos de la divulgación, los fibroblastos son de embrión de pollo. En algunos aspectos de la divulgación, las células son fibroblastos primarios de embrión de pollo.

El cultivo celular puede prepararse en un biorreactor o tradicionalmente en matraces (placas Roux, matraces giratorios, Multitray™, Cell-Cube™, etc.). En algunos aspectos de la divulgación, se usa un biorreactor de gran volumen (por ejemplo, con un volumen de aproximadamente 500-2000 l). El virus se introduce en el cultivo celular. En algunos aspectos de la divulgación, se calcula que la cantidad de virus introducido tiene una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 0,01-0,1. En algunos aspectos de la divulgación, se calcula que la cantidad del virus introducido tiene una MOI inferior a 0,01.

El medio utilizado para recoger virus puede ser cualquier medio adecuado. En algunos aspectos de la divulgación, el medio es MEM. En algunos aspectos de la divulgación, el medio tiene menos de aproximadamente 10 g/l o 5 g/l de proteínas (por ejemplo, albúmina humana).

En algunos aspectos de la divulgación, el virus se recoge en presencia de un suero. En algunos aspectos de la divulgación, el suero no es de origen humano. En algunos aspectos de la divulgación, el suero es de origen animal. En algunos aspectos de la divulgación, el suero es un suero bovino. En algunos aspectos de la divulgación, el suero es un suero fetal o suero de ternera.

El período requerido para la multiplicación y la propagación víricas puede determinarse controlando el título infeccioso. En algunos aspectos de la divulgación, la recogida se realiza mediante simple retirada del medio de multiplicación vírica que contiene los virus producidos por las células. En algunos aspectos de la divulgación, después de haber retirado el medio de multiplicación vírica, se reintroduce medio nuevo en el biorreactor para permitir una mayor multiplicación vírica que conduzca a una recogida adicional. En algunos aspectos de la divulgación, se obtienen al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 recogidas sucesivas en el mismo biorreactor del mismo cultivo celular. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se recoge a una temperatura de aproximadamente 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C o 38 °C. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se recoge a un pH de aproximadamente 6,5-7,8. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se recoge a un pH de aproximadamente 7,0-7,5.

En algunos aspectos de la divulgación, el virus es el virus de la rabia. En algunos aspectos de la divulgación, la cepa del virus es CTN-1V. En algunos aspectos de la divulgación, el virus de la rabia se recoge de un medio (por ejemplo, MEM) complementado con suero bovino fetal o suero de ternera. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se recoge a menos de 33 °C. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se recoge a menos de 37 °C. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se recoge a un pH de aproximadamente 7,0-7,5. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se recoge a un pH de aproximadamente 7,2. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se obtiene de un cultivo de células Vero. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se recoge de un cultivo de células MRC-5. En algunos aspectos de la divulgación, el virus se obtiene de un cultivo de embrión de pollo.

Composiciones de virus de la rabia

En el presente documento se proporcionan composiciones de virus de la rabia producidas mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, las composiciones víricas comprenden una vacuna vírica.

También se proporcionan composiciones de virus de la rabia descritas en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una composición vírica que comprende partículas de virus de la rabia, en donde al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición es proteína vírica, en donde la proteína vírica comprende: al menos aproximadamente el 35-48 % de proteína G. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína del virus comprende además: aproximadamente el 28-37 % de proteína N; aproximadamente el 8-12 % de proteína P; y aproximadamente el 13-16 % de proteína M. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende además un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, el pH de la composición es de aproximadamente 7,5-7,7. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es de color blanco cuando es sólida y en donde una solución de la composición es transparente. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de agua de la composición es inferior al 3 %. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de la composición vírica en ensayo de estabilidad a largo plazo es de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia de la composición en ensayo de estabilidad térmica es de al menos 3 UI/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de albúmina sérica bovina (BSA) es inferior a aproximadamente 10 ng/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es una composición de vacuna vírica. En algunos aspectos de la divulgación, la composición se liofiliza. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica

está sustancialmente exenta de ADN no vírico.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una composición vírica que comprende partículas de virus de la rabia, en donde al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición es proteína vírica, en donde la proteína vírica comprende: al menos aproximadamente el 35-48 % de proteína G y en donde al menos aproximadamente el 80 % de las partículas de virus de la rabia en la composición son partículas víricas intactas. En algunos aspectos de la divulgación, la integridad de las partículas de virus puede determinarse por el tamaño, la forma, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH), las características biofísicas o bioquímicas (por ejemplo, la glicosilación de proteínas de membrana externa). En algunos aspectos de la divulgación, la proteína del virus comprende además: aproximadamente el 28-37 % de proteína N; aproximadamente el 8-12 % de proteína P; y aproximadamente el 13-16 % de proteína M. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende además un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, el pH de la composición es de aproximadamente 7,5-7,7. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es de color blanco cuando es sólida y en donde una solución de la composición es transparente. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de agua de la composición es inferior al 3 %. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad a largo plazo es de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad térmica es de al menos 3 UI/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de albúmina sérica bovina (BSA) es inferior a aproximadamente 10 ng/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es una composición de vacuna vírica. En algunos aspectos de la divulgación, la composición se liofiliza. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está sustancialmente exenta de ADN no vírico.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una composición vírica que comprende partículas de virus de la rabia, en donde al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición es proteína vírica, en donde la proteína vírica comprende: al menos aproximadamente el 35-48 % de proteína G, y en donde la composición está sustancialmente exenta de ADN no vírico. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína del virus comprende además: aproximadamente el 28-37 % de proteína N; aproximadamente el 8-12 % de proteína P; y aproximadamente el 13-16 % de proteína M. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende además un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, el pH de la composición es de aproximadamente 7,5-7,7. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es de color blanco cuando es sólida y en donde una solución de la composición es transparente. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de agua de la composición es inferior al 3 %. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad a largo plazo es de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad térmica es de al menos 3 UI/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de albúmina sérica bovina (BSA) es inferior a aproximadamente 10 ng/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es una composición de vacuna vírica. En algunos aspectos de la divulgación, la composición se liofiliza.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una composición vírica que comprende partículas de virus de la rabia, en donde al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición es proteína vírica, en donde la proteína vírica comprende: al menos aproximadamente 35-48 % de proteína G, y en donde la composición tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína del virus comprende además: aproximadamente el 28-37 % de proteína N; aproximadamente el 8-12 % de proteína P; y aproximadamente el 13-16 % de proteína M. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende además un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, el pH de la composición es de aproximadamente 7,5-7,7. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es de color blanco cuando es sólida y en donde una solución de la composición es transparente. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de agua de la composición es inferior al 3 %. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad a largo plazo es de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad térmica es de al menos 3 UI/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de albúmina sérica bovina (BSA) es inferior a aproximadamente 10 ng/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es una composición de vacuna vírica. En algunos aspectos de la divulgación, la composición se liofiliza. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está sustancialmente exenta de ADN no vírico.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una composición vírica que comprende partículas de virus de la rabia, en donde al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición es proteína vírica, en donde la proteína vírica comprende: al menos aproximadamente el 35-48 % de proteína G, en donde al menos aproximadamente el 80 % de las partículas de virus de la rabia en la composición son partículas víricas intactas, y en donde la composición tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína del virus comprende además: aproximadamente el 28-37 % de proteína N; aproximadamente el 8-12 % de proteína P; y aproximadamente el 13-16 % de proteína M. En

algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende además un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, el pH de la composición es de aproximadamente 7,5-7,7. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es de color blanco cuando es sólida y en donde una solución de la composición es transparente. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de agua de la composición es inferior al 3 %. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad a largo plazo es de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad térmica es de al menos 3 UI/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de albúmina sérica bovina (BSA) es inferior a aproximadamente 10 ng/dosis.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición es una composición de vacuna vírica. En algunos aspectos de la divulgación, la composición se liofiliza. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está sustancialmente exenta de ADN no vírico.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una composición vírica que comprende partículas de virus de la rabia, en donde al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición es proteína vírica, en donde la proteína vírica comprende: al menos aproximadamente el 35-48 % de proteína G, y en donde la composición es estable durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 meses a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína del virus comprende además: aproximadamente el 28-37 % de proteína N; aproximadamente el 8-12 % de proteína P; y aproximadamente el 13-16 % de proteína M.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende además un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, el pH de la composición es de aproximadamente 7,5-7,7. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es de color blanco cuando es sólida y en donde una solución de la composición es transparente. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de agua de la composición es inferior al 3 %. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad a largo plazo es de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad térmica es de al menos 3 UI/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de albúmina sérica bovina (BSA) es inferior a aproximadamente 10 ng/dosis.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición es una composición de vacuna vírica. En algunos aspectos de la divulgación, la composición se liofiliza. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está sustancialmente exenta de ADN no vírico.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una composición vírica que comprende partículas de virus de la rabia, en donde al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición es proteína vírica, en donde la proteína vírica comprende: al menos aproximadamente el 35-48 % de proteína G, en donde al menos aproximadamente el 80 % de las partículas de virus de la rabia en la composición son partículas víricas intactas, en donde al menos aproximadamente el 80 % de las partículas de virus de la rabia en la composición son partículas víricas intactas, y en donde la composición es estable durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 meses a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína del virus comprende además: aproximadamente el 28-37 % de proteína N; aproximadamente el 8-12 % de proteína P; y aproximadamente el 13-16 % de proteína M. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende además un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, el pH de la composición es de aproximadamente 7,5-7,7. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es de color blanco cuando es sólida y en donde una solución de la composición es transparente. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de agua de la composición es inferior al 3 %. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad a largo plazo es de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad térmica es de al menos 3 UI/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de albúmina sérica bovina (BSA) es inferior a aproximadamente 10 ng/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es una composición de vacuna vírica. En algunos aspectos de la divulgación, la composición se liofiliza. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está sustancialmente exenta de ADN no vírico.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una composición vírica que comprende partículas de virus de la rabia, en donde al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición es proteína vírica, en donde la proteína vírica comprende: al menos aproximadamente el 35-48 % de proteína G, en donde al menos aproximadamente el 80 % de las partículas de virus de la rabia en la composición son partículas víricas intactas, en donde la composición tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg, y en donde la composición es estable durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 meses a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína del virus comprende además: aproximadamente el 28-37 % de proteína N; aproximadamente el 8-12 % de proteína P; y aproximadamente el 13-16 % de proteína M. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende además un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, el pH de la composición es de aproximadamente 7,5-7,7. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es de color blanco cuando es sólida y en donde una solución de la composición es transparente. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de agua de la composición es inferior al 3 %. En

algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad a largo plazo es de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad térmica es de al menos 3 UI/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de albúmina sérica bovina (BSA) es inferior a aproximadamente 10 ng/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es una composición de vacuna vírica. En algunos aspectos de la divulgación, la composición se liofiliza. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está sustancialmente exenta de ADN no vírico.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una composición vírica que comprende partículas de virus de la rabia, en donde al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición es proteína vírica, en donde la proteína vírica comprende: al menos aproximadamente el 35-48 % de proteína G, en donde al menos aproximadamente el 80 % de las partículas de virus de la rabia en la composición son partículas víricas intactas, en donde al menos aproximadamente el 80 % de las partículas de virus de la rabia en la composición son partículas víricas intactas, en donde la composición tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg, y en donde la composición es estable durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 meses a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína del virus comprende además: aproximadamente el 28-37 % de proteína N; aproximadamente el 8-12 % de proteína P; y aproximadamente el 13-16 % de proteína M. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende además un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, el pH de la composición es de aproximadamente 7,5-7,7. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es de color blanco cuando es sólida y en donde una solución de la composición es transparente. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de agua de la composición es inferior al 3 %. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad a largo plazo es de al menos aproximadamente 4 UI/dosis o 4 UI/25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición en ensayo de estabilidad térmica es de al menos 3 UI/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, el contenido de albúmina sérica bovina (BSA) es inferior a aproximadamente 10 ng/dosis. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es una composición de vacuna vírica. En algunos aspectos de la divulgación, la composición se liofiliza. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está sustancialmente exenta de ADN no vírico.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende partículas de virus de la rabia y al menos aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 % o 95 % de las partículas de virus de la rabia en la composición son partículas intactas. La integridad de las partículas de virus puede determinarse por el tamaño, la forma, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH), las características biofísicas o bioquímicas (por ejemplo, la glicosilación de proteínas de membrana externa).

En algunos aspectos de la divulgación, la integridad puede determinarse observando el aspecto de las partículas de virus. El tamaño del virus de la rabia es de aproximadamente 75x180 nm. En algunos aspectos de la divulgación, la partícula de virus está intacta cuando el tamaño es aproximadamente el tamaño del virus de la rabia (por ejemplo, al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o como máximo el 105 %, 110 %, 115 %, 120 %, 125 % o 130 % del tamaño del virus de la rabia). El tamaño de partícula puede analizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por medio de microscopía electrónica o la máquina zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), que mide el movimiento browniano de las partículas basándose en la dispersión de luz "caselástica" (dispersión de luz dinámica).

El virus de la rabia tiene la clásica forma de bala. En algunos aspectos de la divulgación, la partícula de virus está intacta cuando la forma de la partícula de virus coincide con la forma del virus de la rabia. En algunos aspectos de la divulgación, la partícula de virus está intacta cuando el tamaño de la partícula es aproximadamente el tamaño del virus de la rabia y la forma de la partícula coincide con la forma del virus de la rabia.

En algunos aspectos de la divulgación, la integridad de las partículas de virus puede determinarse por su inmunogenicidad. Por ejemplo, la integridad de las partículas de virus puede determinarse comparando la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de una determinada cantidad de partículas de virus en el cultivo celular o animal con la potencia de virus intactos conocidos de la misma cantidad después de infectar células o animales.

En algunos aspectos de la divulgación, aproximadamente o al menos aproximadamente el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 % o 95 % de la proteína total en la composición es proteína vírica.

En algunos aspectos de la divulgación, la proteína vírica comprende aproximadamente o al menos aproximadamente el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 47 % de proteína G. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína vírica comprende aproximadamente el 25-70 %, 30-60 %, 35-55 % o 35-48 % de proteína G.

En algunos aspectos de la divulgación, la proteína vírica comprende aproximadamente o al menos aproximadamente el 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o 30 % de proteína N. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína vírica comprende aproximadamente el 10-50 %, 20-40 % o 25-35 % de proteína N.

En algunos aspectos de la divulgación, la proteína vírica comprende aproximadamente o al menos aproximadamente el 3 %, 5 %, 6 %, 7 % u 8 % de proteína P. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína vírica comprende aproximadamente el 3-20 %, 5-15 %, 7-13 % u 8-12 % de proteína P.

5 En algunos aspectos de la divulgación, la proteína vírica comprende aproximadamente o al menos aproximadamente el 5 %, 8 %, 10 %, 12 % o 13 % de proteína M. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína vírica comprende aproximadamente el 5-25 %, 8-20 %, 10-18 % o 12-16 % de proteína M.

10 En algunos aspectos de la divulgación, la proteína G comprende oligosacárido, en donde la relación en peso de oligosacárido con respecto a la proteína G es de aproximadamente o al menos aproximadamente el 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 22,5, 25, 27,5 o 30 por ciento. En algunos aspectos de la divulgación, la relación en peso de oligosacárido con respecto a la proteína G es de aproximadamente el 5-40, 10-35, 20-30 o 24-30 por ciento.

15 En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está esencialmente exenta de ADN no vírico. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está esencialmente exenta de ADN de las células hospedadoras. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica tiene menos de menos de aproximadamente 100 pg, 80 pg, 60 pg, 40 pg o 20 pg de ADN no vírico o ADN de células hospedadoras por dosis, en donde cada dosis tiene una potencia de al menos 2,5 UI (ensayo de NIH). En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica tiene menos de menos de aproximadamente 100 pg, 80 pg, 60 pg, 40 pg o 20 pg de ADN no vírico o ADN de células hospedadoras por cada 50 µg.

25 En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está esencialmente exenta de proteína no vírica. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está esencialmente exenta de proteína de las células hospedadoras. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende aproximadamente o menos de aproximadamente 4 µg, 3 µg, 2 µg, 1 µg, 0,8 µg, 0,7 µg, 0,6 µg o 0,5 µg de proteína no vírica o proteína de células hospedadoras, en donde cada dosis tiene una potencia de al menos aproximadamente 2,5 UI (ensayo de NIH). En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende aproximadamente o menos de aproximadamente 4 µg, 3 µg, 2 µg, 1 µg, 0,8 µg, 0,7 µg, 0,6 µg o 0,5 µg de proteína no vírica o proteína de células hospedadoras por cada 50 µg.

35 En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está esencialmente exenta de una albúmina sérica. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina sérica es de origen animal. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina sérica es de origen humano. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina sérica es de origen bovino. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina sérica es albúmina sérica bovina fetal. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina sérica es albúmina sérica de ternera. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende aproximadamente o menos de aproximadamente 50 ng, 40 ng, 30 ng, 20 ng, 10 ng, 8 ng, 6 ng, 5 ng, 4 ng, 3 ng, 2 ng o 1 ng de la albúmina sérica en cada dosis, en donde cada dosis tiene una potencia de al menos aproximadamente 2,5 UI (ensayo de NIH). En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende aproximadamente o menos de aproximadamente 50 ng, 40 ng, 30 ng, 20 ng, 10 ng, 8 ng, 6 ng, 5 ng, 4 ng, 3 ng, 2 ng o 1 ng de la albúmina sérica por cada 50 µg.

45 En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica tiene un pH de aproximadamente 7,2-8,0, 7,4-7,8, 7,5-7,7 o 7,6-7,7. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica tiene un contenido de agua de aproximadamente o menos de aproximadamente el 3 %, 2,9 %, 2,8 %, 2,7 %, 2,6 %, 2,5 %, 2,4 %, 2,3 %, 2,2 %, 2,1 %, 1,9 %, 1,8 %, 1,7 %, 1,6 %, 1,5 %. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica tiene una osmolalidad de aproximadamente 300-450, 350-400 o 370-390 mOsmol/kg.

50 En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de aproximadamente o al menos aproximadamente 2,5 UI, 3 UI, 3,5 UI, 4 UI, 4,5 UI o 5 UI por dosis o por cada 25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica es de color blanco y/o suelta cuando es sólida. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está en una solución, en donde la solución es transparente. En algunos aspectos de la divulgación, la solución es un tampón de fosfato.

55 En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica es estable durante o al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses a temperatura ambiente (por ejemplo, a aproximadamente 20-25 °C) o en condiciones de refrigeración (por ejemplo, a aproximadamente 2-8 °C). En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica es estable durante al menos aproximadamente 14, 28, 31, 35, 39 o 42 días a aproximadamente 35-40 °C (por ejemplo, 37 °C). La composición vírica es estable cuando la composición tiene aproximadamente o al menos aproximadamente 2,5 UI, 3 UI, 3,5 UI, 4 UI, 4,5 UI o 5 UI por dosis o por cada 25 µg después de mantenerla durante dicho período de tiempo en dichas condiciones o temperatura. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de aproximadamente o al menos aproximadamente 3 UI, 3,5 UI, 4 UI, 4,5 UI, 5 UI, 5,5 UI, 6 UI, 6,6 UI, 7 UI, 7,5 UI, 8 UI, 8,5 UI por dosis o por cada 25 µg después de mantenerla durante dicho período de tiempo en dichas condiciones o temperatura. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica después de mantenerla durante más de 3 meses (por ejemplo, aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses) a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración tiene una potencia (por ejemplo, ensayo

de NIH) que no disminuye en más de aproximadamente el 2,5 %, 5 %, 10 %, 15 % o 20 % en comparación con la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) después de mantenerla durante 3 meses en dichas condiciones. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica después de mantenerla durante más de 28 días a aproximadamente 35-40 °C (por ejemplo, 37 °C) tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) que no disminuye en más de

5 aproximadamente el 2,5 %, 5 %, 10 %, 15 % o 20 % en comparación con la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) después de mantenerla durante 28 días en dichas condiciones.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de aproximadamente o al menos aproximadamente 2,5 UI, 2,6 UI, 2,7 UI, 2,8 UI, 2,9 UI, 3 UI, 3,1 UI, 3,2 UI, 3,3 UI por

10 dosis o por cada 25 µg en ensayo de estabilidad térmica. El ensayo de estabilidad se realiza manteniendo la composición a una temperatura alta (por ejemplo, una temperatura superior a la temperatura ambiente, por ejemplo, superior a aproximadamente 30 °C, por ejemplo, aproximadamente 35-40 °C, por ejemplo, aproximadamente 37 °C) durante un período de tiempo (por ejemplo, aproximadamente o al menos aproximadamente 14, 28, 31, 35, 39 o 42 días), y evaluando la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) del virus en la composición después dicho periodo de

15 tiempo.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende además un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y/o albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende aproximadamente el 0,1-10 %, 0,5-5 %, 1-5 % o 1-3 % de albúmina. En algunos

20 aspectos de la divulgación, la albúmina es una albúmina humana. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina es una albúmina sérica humana. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende aproximadamente el 0,1-20 %, 1-10 %, 3-10 % o 3-6 % de sacarosa.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de fosfato tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,0, 7,2-8,5 o 7,2-8,0.

25

En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador o la composición vírica están exentos de gelatina, dextrano, trehalosa, tensioactivos y/o proteínas animales.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica está liofilizada. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica liofilizada tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de aproximadamente 2,5 UI, 5 UI, 7,5 UI o 10 UI por dosis o por cada 25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de la composición vírica liofilizada disminuye en aproximadamente o menos de aproximadamente el 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 40 %. En algunos aspectos de la divulgación, el virus liofilizado tiene un contenido de agua de

30 aproximadamente o menos de aproximadamente el 3 %, 2,9 %, 2,8 %, 2,7 %, 2,6 %, 2,5 %, 2,4 %, 2,3 %, 2,2 %, 2,1 %, 1,9 %, 1,8 %, 1,7 %, 1,6 %, 1,5 %.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica liofilizada es estable durante o al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses a temperatura ambiente (por ejemplo, a aproximadamente 20-25 °C) o en condiciones de refrigeración (por ejemplo, a aproximadamente 2-8 °C). En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica liofilizada es estable durante al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5 o 6 semanas a aproximadamente 37 °C. La composición vírica liofilizada es estable cuando la composición tiene aproximadamente o al menos aproximadamente 2,5 UI, 3 UI, 3,5 UI, 4 UI, 4,5 UI o 5 UI por dosis o por cada 25 µg después de mantenerla durante dicho período de tiempo en dichas condiciones o temperatura. En algunos aspectos de la divulgación, la

40 composición vírica liofilizada tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de aproximadamente o al menos aproximadamente 3 UI, 3,5 UI, 4 UI, 4,5 UI, 5 UI o 5,5 UI por dosis o por cada 25 µg después de mantenerla durante dicho período de tiempo en dichas condiciones o temperatura. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica liofilizada después de mantenerla durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 meses a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) que no disminuye en más de aproximadamente el 5 %, 7,5 %, 10 %, 12,5 %, 15 %, 17,5 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % en comparación con la potencia del virus liofilizado (por ejemplo, ensayo de NIH) antes de mantenerlo en dichas condiciones. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica liofilizada después de mantenerla durante 3, 4, 5 o 6 semanas a aproximadamente 37 °C tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) que no disminuye en más de aproximadamente el 25 %, 30 %, 35 %, 37,5 %, 40 %, 45 %, 50 % en comparación con la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) después de mantenerla durante 28

55 días en dichas condiciones.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica liofilizada tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de aproximadamente o al menos aproximadamente 2,5 UI, 2,6 UI, 2,8 UI, 3 UI, 3,2 UI, 3,4 UI, 3,6 UI, 3,8 UI, 4 UI, 4,1 UI por dosis o por cada 25 µg en ensayo de estabilidad térmica. El ensayo de estabilidad se realiza manteniendo la composición liofilizada a una temperatura alta (por ejemplo, una temperatura superior a la temperatura ambiente, por ejemplo, superior a aproximadamente 30 °C, por ejemplo, aproximadamente 35-40 °C, por ejemplo, aproximadamente 37 °C) durante un período de tiempo (por ejemplo, aproximadamente o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6 semanas), y evaluando la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de la composición vírica liofilizada después de dicho período de tiempo.

60

En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica liofilizada se redisuelve en una solución en menos de 60,

65

50, 40, 30, 20, 15, 10 segundos.

En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica liofilizada tiene un contenido de agua de aproximadamente o menos de aproximadamente el 3 %, 2,8 %, 2,6 %, 2,4 %, 2,2 %, 2 %, 1,8 %, 1,6 % o 1,5 %.

5

Formulación de vacuna

En el presente documento se proporcionan métodos de una formulación de vacuna y formulaciones de vacuna. La vacuna puede ser cualquier vacuna y no se limita a las vacunas descritas en el presente documento o producidas con un método descrito en el presente documento.

10

En algunos aspectos de la divulgación, la vacuna comprende virus inactivados. En algunos aspectos de la divulgación, la vacuna comprende virus completo inactivado. Las vacunas de virus completo inactivado con frecuencia se administran por vía subcutánea o por vía intramuscular porque dichas administraciones pueden reclutar células inmunitarias, especialmente células presentadoras de antígenos (CPA) y citocinas relacionadas al área local para inducir rápidamente al cuerpo a producir una respuesta inmunitaria protectora. Los productos de vacuna por lo general se preparan en forma de solución o polvo liofilizado. Hablando relativamente, el polvo liofilizado puede conservarse y transportarse de forma más fácil y cómoda, y puede conservarse durante un período de tiempo más largo para su uso.

15

Los excipientes o aditivos de vacunas utilizados en la formulación de vacuna son ingredientes indispensables en la formulación de vacuna. Pueden proporcionar formas farmacéuticas, propiedades físicas, químicas, farmacológicas y biológicas necesarias de la vacuna. También tienen una función fundamental en la estabilidad y actividad biológica de la vacuna, su calidad de producto y el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas y/o clases.

20

Entre una y sesenta y cuatro de cada 10.000 personas que recibieron la vacuna contra la encefalitis japonesa tuvieron reacciones alérgicas, urticaria sistémica grave, angioedema facial o dificultad respiratoria. De acuerdo con la OMS, las reacciones adversas pueden atribuirse a un estabilizador de la vacuna, la gelatina. Estudios recientes han demostrado que las personas que tuvieron reacciones alérgicas a la vacunación contra el sarampión monovalente, las paperas y la rubéola tenían anticuerpos de inmunoglobulina E contra la gelatina, que también es un estabilizador en la vacuna. Por lo tanto, una proporción considerable de las reacciones adversas provocadas por la vacuna pueden deberse a los excipientes y/o aditivos. Los excipientes o aditivos añadidos como complemento a los productos biológicos ya no se consideran sustancias inactivas.

25

30

La formulación de la vacuna contra la rabia con frecuencia contiene excipientes y/o aditivos tales como gelatina, trehalosa y tensioactivos, que pueden proporcionar protección a la vacuna durante la liofilización y la conservación, pero que también pueden tener un efecto sobre la seguridad del producto.

35

Se proporciona un método de producción de una formulación de vacuna que comprende combinar la vacuna con un estabilizador. En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador comprende sacarosa y/o albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, la formulación de vacuna comprende aproximadamente el 0,1-10 %, 0,5-5 %, 1-5 % o 1-3 % de albúmina. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina es una albúmina humana. En algunos aspectos de la divulgación, la albúmina es una albúmina sérica humana. En algunos aspectos de la divulgación, la formulación de virus comprende aproximadamente el 0,1-20 %, 1-10 %, 3-10 % o 3-6 % de sacarosa.

40

En algunos aspectos de la divulgación, la formulación de virus comprende un tampón de fosfato. En algunos aspectos de la divulgación, el tampón de fosfato tiene un pH de aproximadamente 7,0-9,0, 7,2-8,5 o 7,2-8,0.

45

En algunos aspectos de la divulgación, el estabilizador o la formulación de virus están exentos o esencialmente exentos de gelatina, dextrano, trehalosa, tensioactivos y/o proteínas animales.

50

En algunos aspectos de la divulgación, el método comprende además liofilizar la formulación de vacuna. En algunos aspectos de la divulgación, la formulación de virus liofilizado tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de aproximadamente 2,5 UI, 5 UI, 7,5 UI o 10 UI por dosis o por cada 25 µg. En algunos aspectos de la divulgación, la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de la formulación de virus liofilizado disminuye en aproximadamente o menos de aproximadamente el 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 40 %.

55

En algunos aspectos de la divulgación, la formulación de virus liofilizado es estable durante o al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses a temperatura ambiente (por ejemplo, a aproximadamente 20-25 °C) o en condiciones de refrigeración (por ejemplo, a aproximadamente 2-8 °C). En algunos aspectos de la divulgación, la formulación de virus liofilizado es estable durante al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5 o 6 semanas a aproximadamente 37 °C. La formulación de virus liofilizado es estable cuando la formulación tiene aproximadamente o al menos aproximadamente 2,5 UI, 3 UI, 3,5 UI, 4 UI, 4,5 UI o 5 UI por dosis o por cada 25 µg después de mantenerla durante dicho período de tiempo en dichas condiciones o temperatura. En algunos aspectos de la divulgación, la formulación de virus liofilizado tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de aproximadamente o al menos aproximadamente 3 UI, 3,5 UI, 4 UI, 4,5 UI, 5 UI o 5,5 UI por dosis o por cada 25 µg después de mantenerla durante dicho período de tiempo en dichas condiciones o temperatura. En algunos aspectos de la divulgación, la formulación

60

65

- de virus liofilizado después de mantenerla durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 meses a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) que no disminuye en más de aproximadamente el 5 %, 7,5 %, 10 %, 12,5 %, 15 %, 17,5 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % en comparación con la potencia del virus liofilizado (por ejemplo, ensayo de NIH) antes de mantenerlo en dichas condiciones. En algunos aspectos de la divulgación, la formulación de virus liofilizado después de mantenerla durante 3, 4, 5 o 6 semanas a aproximadamente 37 °C tiene una potencia de virus (por ejemplo, ensayo de NIH) que no disminuye en más de aproximadamente el 25 %, 30 %, 35 %, 37,5 %, 40 %, 45 %, 50 % en comparación con la potencia de virus (por ejemplo, ensayo de NIH) después de mantenerla durante 28 días en dichas condiciones.
- En algunos aspectos de la divulgación, la formulación de virus liofilizado tiene una potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de aproximadamente o al menos aproximadamente 2,5 UI, 2,6 UI, 2,8 UI, 3 UI, 3,2 UI, 3,4 UI, 3,6 UI, 3,8 UI, 4 UI, 4,1 UI por dosis o por cada 25 µg en ensayo de estabilidad térmica. El ensayo de estabilidad se realiza manteniendo la formulación liofilizada a una temperatura alta (por ejemplo, una temperatura superior a la temperatura ambiente, por ejemplo, superior a aproximadamente 30 °C, por ejemplo, aproximadamente 35-40 °C, por ejemplo, aproximadamente 37 °C) durante un período de tiempo (por ejemplo, aproximadamente o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6 semanas), y evaluando la potencia (por ejemplo, ensayo de NIH) de la formulación de virus liofilizado después de dicho período de tiempo.
- En algunos aspectos de la divulgación, la formulación de virus liofilizado tiene un contenido de agua de aproximadamente o menos de aproximadamente el 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1,5 %.

Métodos de evaluación de la idoneidad y liberación de composiciones de vacuna

- En el presente documento se proporcionan métodos de evaluación de la idoneidad de una composición de vacuna de virus con envoltura que comprende partículas de virus para su uso clínico y métodos de liberación de un lote comercial de una composición de vacuna de virus con envoltura que comprende partículas de virus para su uso clínico. En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden determinar el porcentaje de proteínas víricas de la proteína total en la composición y/o determinar el porcentaje relativo de una o más proteínas de membrana externa en las proteínas víricas. En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden determinar el porcentaje de virus intacto en la composición de vacuna. Los métodos de evaluación de la integridad incluyen los métodos descritos en el presente documento y cualquier método conocido en la técnica.
- En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica es adecuada para su uso clínico si el porcentaje de proteínas víricas de la proteína total en la composición es de aproximadamente o al menos aproximadamente el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92,5 % o 95 %. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica es adecuada para su uso clínico si el porcentaje relativo de una o más proteínas de membrana externa en las proteínas víricas es de aproximadamente o al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o el 5-10 %, 10-15 %, 15-20 %, 20-25 %, 25-30 %, 30-35 %, 35-40 %, 40-45 %, 45-50 %, 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 % o 75-80 %. En algunos aspectos de la divulgación, la composición vírica es adecuada para su uso clínico si al menos aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de las partículas de virus en la composición son virus intactos.
- En algunos aspectos de la divulgación, el porcentaje de las proteínas víricas de las proteínas totales en la composición se determina mediante SDS-PAGE. En algunos aspectos de la divulgación, el porcentaje relativo de la una o más proteínas de membrana externa en las proteínas víricas se determina mediante HPLC. En algunos aspectos de la divulgación, la integridad de las partículas de virus se determina mediante microscopía electrónica.

A. Virus de la rabia

- En el presente documento se proporcionan métodos de evaluación de la idoneidad de una composición de vacuna de virus que comprende partículas de virus de la rabia para su uso clínico y métodos de liberación de un lote comercial de una composición de vacuna de virus que comprende partículas de virus de la rabia para su uso clínico. En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden a) determinar el porcentaje de proteínas víricas de la proteína total en la composición y b) determinar el porcentaje relativo de proteína G en la proteína vírica. En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden además determinar los porcentajes relativos de proteína N, P y/o M en la proteína vírica.
- En algunos aspectos de la divulgación, la composición es adecuada para su uso clínico si 1) al menos aproximadamente el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92,5 % o 95 % de la proteína total en la composición total es proteína vírica; y/o 2) la proteína vírica comprende aproximadamente o al menos aproximadamente el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o el 10-15 %, 15-20 %, 20-25 %, 25-30 %, 30-35 %, 35-40 %, 40-45 %, 45-50 %, 50-55 %, 55-60 %, 60-65 % o 65-70 % de proteína G. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es adecuada para su uso clínico si 1) al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición total es proteína vírica; y/o 2) la proteína vírica comprende aproximadamente o al menos aproximadamente el 25-70 %, 30-60 %, 35-55 % o 35-48 % de proteína G.

- En algunos aspectos de la divulgación, el lote de la composición vírica puede liberarse o se libera si 1) al menos aproximadamente el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92,5 % o 95 % de la proteína total en la composición total es proteína vírica; y/o 2) la proteína vírica comprende aproximadamente o al menos aproximadamente el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o el 5-10 %, 10-15 %, 15-20 %, 20-25 %, 25-30 %, 30-35 %, 35-40 %, 40-45 %, 45-50 %, 50-55 %, 55-60 %, 60-65 % o 65-70 % de proteína G. En algunos aspectos de la divulgación, la composición es adecuada para su uso clínico si 1) al menos aproximadamente el 80 % de la proteína total en la composición total es proteína vírica; y/o 2) la proteína vírica comprende aproximadamente o al menos aproximadamente el 25-70 %, 30-60 %, 35-55 % o 35-48 % de proteína G.
- En algunos aspectos de la divulgación, la proteína vírica en la composición comprende además: aproximadamente, al menos aproximadamente el 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o 30 % o el 10-50 %, 20-40 % o 25-35 % de proteína N; y/o, al menos aproximadamente el 3 %, 5 %, 6 %, 7 % u 8 % o el 3-20 %, 5-15 %, 7-13 % u 8-12 % de proteína P; y/o, al menos aproximadamente el 5 %, 8 %, 10 %, 12 %, 13 % o el 5-25 %, 8-20 %, 10-18 % o 12-16 % de proteína M.
- El porcentaje de las proteínas víricas de las proteínas totales en la composición puede determinarse mediante SDS-PAGE. En algunos aspectos de la divulgación, el porcentaje relativo de la una o más proteínas de membrana externa en las proteínas víricas se determina mediante HPLC. En algunos aspectos de la divulgación, la integridad de las partículas de virus se determina mediante microscopía electrónica.

20 Ejemplos

Ejemplo 1: La purificación de virus de múltiples fuentes

- En este ejemplo, los métodos de aislamiento de virus en la presente divulgación se demuestran aplicando los métodos a muestras biológicas recogidas de cultivo de células Vero (cultivo en matraz giratorio, cultivo en matraz cuadrado, cultivo en biorreactor), cultivo de células diploides humanas y cultivo de embriones de pollo en los que las células se infectaron con la cepa CTN-1 del virus de la rabia.

A. Pretratamiento de las muestras biológicas

- Las muestras biológicas recogidas se filtraron a través de un filtro de membrana microporosa con un tamaño de poro de 0,45 µm.

B. Cromatografía de intercambio aniónico ("IA")

- Después, las muestras filtradas se sometieron a una cromatografía de IA en las siguientes condiciones. En primer lugar, se preequilibró una columna Capto-DEAE con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 150 mM. Después, las muestras filtradas se cargaron en la columna. Después de la carga, se aplicaron a la columna 2-5 volúmenes de columna del tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 150 mM para equilibrar la columna. Después, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 200 mM para preeluir la columna. Después de la etapa de preelución, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 500 mM para eluir la columna. El eluato ("el eluato de IA") se recogió de acuerdo con el pico o picos de absorción de luz indicados por el detector de cromatografía.

C. Cromatografía en hidroxiapatita ("HA")

- El eluato de IA recogido de la cromatografía de IA como se ha descrito anteriormente se sometió después a una cromatografía en HA en las siguientes condiciones. En primer lugar, se preequilibró una columna CHT con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6. Después, se cargó en la columna el eluato A. Después de la carga, se aplicaron a la columna 2-5 volúmenes de columna del tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 para equilibrar la columna. Después, la columna se cargó con un tampón de fosfato 100 mM que tenía un pH de 7,6 para preeluir la columna. Después de la etapa de preelución, la columna se cargó con un tampón de fosfato 200 mM que tenía un pH de 7,6 para eluir la columna. El eluato ("el eluato de HA") se recogió de acuerdo con el pico o picos de absorción de luz indicados por el detector de cromatografía.

D. Evaluación de la pureza y otros parámetros del virus purificado

- Después de que los virus se recogiesen de diferentes fuentes, incluyendo el cultivo de células Vero (cultivo en matraz giratorio, cultivo en matraz cuadrado, cultivo en biorreactor), el cultivo de células diploides humanas y el cultivo de embriones de pollo, y se purificasen mediante la cromatografía de IA y en HA secuencialmente como se analizó anteriormente, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). El gel se sometió a tinción con plata o azul de Coomassie y se escaneó en el sistema de formación de imágenes en gel. Se usó el método de normalización del área del pico para calcular la proporción de cada proteína del virus en la proteína total. La pureza del virus se calculó sumando la proporción de todas las proteínas del virus. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y FIG. 1. Los productos víricos recogidos de diferentes lotes tenían una pureza, potencia y composición de proteínas del virus comparables.

Las muestras en diferentes fases del proceso de purificación también se evalúan mediante análisis por SDS-PAGE. Véase la **FIG. 2**. Los resultados mostraron que cada etapa de cromatografía ha logrado un efecto de purificación significativo.

5 Los residuos de ADN de células Vero en el virus purificado y la potencia (ensayo de NIH) se determinaron de acuerdo con el método descrito en el Volumen 3 de la Farmacopea de la República Popular China publicado en 2015.

Tabla 1. Características del virus objetivo purificado recogido de diferentes fuentes

Fuente	Pureza (%)	Composición de proteínas del virus (G:N:P:M)	Potencia (ensayo de NIH) (UI/50 ug)
Célula Vero (matraz giratorio)	96,3	47,3:30,2:8,9:13,6	11,7
Célula Vero (matraz cuadrado)	95,7	47,2:29,6:9,4:13,8	10,4
Célula Vero (biorreactor)	96,01	47,1:29,6:9,2:14,1	14,2
Célula diploide humana	95,7	47,5:29,9:8,9:13,7	14,6
Embrión de pollo	98,2	47,7:30,0:9,3:13,0	9,2

10 Ejemplo 2: La purificación de virus en diferentes condiciones cromatográficas

En este ejemplo, los métodos de aislamiento de virus en la presente divulgación se demuestran aplicando los métodos a muestras biológicas recogidas del cultivo de células Vero en las que las células se infectaron con la cepa CTN-1 del virus de la rabia.

15 A. Pretratamiento de las muestras biológicas

Las muestras biológicas recogidas se filtraron a través de un filtro de membrana microporosa con un tamaño de poro de 0,45 µm.

20 B. Cromatografía de intercambio aniónico ("IA")

Después, las muestras filtradas se sometieron a una cromatografía de IA en las siguientes condiciones. En primer lugar, se preequilibró una columna Capto-DEAE con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 150 mM. Después, las muestras filtradas se cargaron en la columna. Después de la carga, se aplicaron a la columna 2-5 volúmenes de columna del tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 150 mM para equilibrar la columna. Después, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 200 mM para preeluir la columna. Después de la etapa de preelución, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 500 mM para eluir la columna. El eluato ("el eluato de IA") se recogió de acuerdo con el pico o picos de absorción de luz indicados por el detector de cromatografía.

30 C. Cromatografía en hidroxipatita ("HA")

El eluato A recogido de la cromatografía de IA como se ha descrito anteriormente se sometió después a una cromatografía en HA en las siguientes condiciones. En primer lugar, se preequilibró una columna CHT con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6. Después, se cargó en la columna el eluato A. Después de la carga, se aplicaron a la columna 2-5 volúmenes de columna del tampón de fosfato 50 mM que tenía un pH de 7,6 para equilibrar la columna. Después, la columna se cargó con un tampón de fosfato 100 mM que tenía un pH de 7,6 para preeluir la columna. Después de la etapa de preelución, la columna se cargó con los siguientes tres tampones de elución cronológicamente y se recogió respectivamente un eluato diferente durante cada etapa. El primer tampón de elución, un tampón de fosfato 100 mM que tenía un pH de 7,6, se aplicó a la columna en primer lugar y se recogió el eluato A ("el eluato A de HA"). Posteriormente, el segundo tampón de elución, un tampón de fosfato 200 mM que tenía un pH de 7,6, se aplicó a la columna en segundo lugar y se recogió el eluato B ("el eluato B de HA"). Por último, el tercer tampón de elución, un tampón de fosfato 300 mM que tenía un pH de 7,6, se aplicó a la columna y se recogió el eluato C ("el eluato C de HA").

40 D. Evaluación de la pureza y otros parámetros del virus purificado

La pureza, las proporciones de proteínas, la potencia (ensayo de NIH) y el residuo de ADN de células Vero del virus purificado como se ha descrito anteriormente se evaluaron con los métodos descritos en el Ejemplo 1D. Los resultados se mostraron en la Tabla 2 como se muestra a continuación.

Tabla 2 Características del virus objetivo purificado en diferentes condiciones de cromatografía en HA.

Eluato	Pureza (%)	Composición de proteínas del virus (G:N:P:M)	Potencia (ensayo de NIH) (UI/50 ug)	Residuo de ADN de célula Vero (pg/ml)
Eluato A de HA	86,7	37,1:35,5:11,8:15,6	4,8	< 100
Eluato B de HA	96,3	46,4:29,4:10,2:14,0	12,2	< 100
Eluato C de HA	95,9	45,3:29,9:10,4:14,4	8,8	> 500

Ejemplo 3: Producción de vacuna contra el virus de la rabia recogida de células Vero y evaluación de la calidad del producto**A. Recogida de virus****2) Preparación de células semilla Vero**

Se descongelaron células Vero criopreservadas a 38-40 °C y se replantaron en un matraz de cultivo celular con medio de cultivo celular M199 complementado con suero bovino fetal (FBS) al 5 %. Después de que las células se cultivasen durante 72-96 horas a 37 °C, las células Vero se digirieron con tripsina y se subcultivaron a una relación de 1:4 en matraces de cultivo celular nuevos para su proliferación durante cinco generaciones, o hasta que se obtuvo un número suficiente de células semilla para el cultivo celular a gran escala en biorreactor.

3) Expansión del biorreactor de células Vero

Después de la confluencia de las células semilla en los matraces, las células se tripsinizaron y se suspendieron en medios de cultivo. Se combinaron suspensiones celulares de múltiples matraces de cultivo y se inocularon en un biorreactor con medio de cultivo M199 complementado con suero de ternera (CS) al 10 %. Las condiciones de cultivo se establecieron de la siguiente manera: 37 °C; pH 7,2; y oxígeno disuelto al 35 %. El cultivo celular estuvo bajo perfusión continua para expulsar el caldo de cultivo y añadir medio nuevo.

4) Inoculación del virus de la rabia

Después de que las células se cultivasen en el biorreactor durante seis días, las células se transfectaron con la cepa CTN-1V del virus de la rabia con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01-0,1. Después de la transfección, el virus se recogió en condiciones de 33 °C; pH 7,6; y concentración de oxígeno disuelto del 35 %. Se recogieron soluciones de virus y se añadió solución de mantenimiento nueva bajo perfusión continua.

5) Producción de una muestra de virus

Las soluciones de virus recogidas se agruparon para preparar un lote de muestra de virus para su uso posterior.

B. Evaluación de la muestra de virus

La muestra de virus recogida de las células Vero se evaluó para determinar el título de virus, el contenido de antígeno por ELISA, la esterilidad y la existencia de micoplasma. Los resultados se mostraron en la Tabla 3 como se muestra a continuación.

Tabla 3. Resultados de ensayo para la muestra de virus (virus recogido de células Vero en biorreactor).

Ensayo	Resultado
Título de virus (DL ₅₀ de Ig/ml)	7,02
contenido de antígeno (ELISA) (UE/ml)	6,0
Ensayo de esterilidad	Estéril
Ensayo de micoplasma	Cumple.

C. Purificación del virus**1) Pretratamiento de la muestra de virus**

Las muestras de virus recogidas de células Vero como se describió anteriormente se sometieron a un aclarado por filtración para retirar las células exfoliadas y los residuos celulares antes de la purificación.

2) Cromatografía de intercambio aniónico ("IA")

Después, las muestras de virus filtradas se sometieron a una cromatografía de IA en las siguientes condiciones. En primer lugar, se preequilibró una columna Capto-DEAE con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 150 mM. Después, se cargaron en la columna aproximadamente 20 volúmenes de columna de las muestras filtradas. Después de la carga, se aplicaron a la columna 2-5 volúmenes de columna del tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 150 mM para equilibrar la columna. Después, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 250 mM para preeluir la columna. Después de la etapa de preelución, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 550 mM para eluir la columna. El eluato ("el eluato de IA") se recogió de acuerdo con el pico o picos de absorción de luz indicados por el detector de cromatografía.

3) Cromatografía en hidroxipatita ("HA")

El eluato de IA recogido de la cromatografía de IA como se ha descrito anteriormente se sometió después a una cromatografía en HA en las siguientes condiciones. En primer lugar, se preequilibró una columna CHT con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6. Después, se cargó en la columna el eluato A. Después de la carga, se aplicaron a la columna 2-5 volúmenes de columna del tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 para equilibrar la columna. Después, la columna se cargó con un tampón de fosfato 100 mM que tenía un pH de 7,6 y NaCl 150 mM para preeluir la columna. Después de la etapa de preelución, la columna se cargó con un tampón de fosfato 200 mM que tenía un pH de 7,6 y NaCl 150 mM para eluir la columna. El eluato ("el eluato de HA") se recogió de acuerdo con el pico o picos de absorción de luz indicados por el detector de cromatografía.

D. Inactivación del virus

Al eluato de HA obtenido de acuerdo con el método descrito anteriormente se le añadió β -propiolactona a una concentración final de 1/4000 para inactivar el virus a 2-8 °C durante 24 horas. Después, la mezcla se trasladó a agua a 37 °C durante dos horas para hidrolizar la β -propiolactona.

E. Desalinización y preparación de solución madre de vacuna

Después, el eluato de HA se desalinizó usando una cromatografía en columna de filtración en gel S-200. Después de la cromatografía, se preparó una solución madre de vacuna usando un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y NaCl 50 mM.

F. Evaluación de la solución madre de vacuna

Se sometió a ensayo la solución madre de vacuna para determinar el contenido de proteína del Virus, residuos de ADN y proteína de células Vero en dos métodos.

1) ELISA

Para evaluar el contenido del principio activo en la solución madre de vacuna, se usó un kit de ELISA comercial denominado "kit de contenido relativo de antígeno vírico para detectar antígeno vírico en la vacuna contra el virus de la rabia para seres humanos" para evaluar el contenido del antígeno o antígenos marcados con enzima.

2) Texto de contenido de proteína

Se evaluó el contenido de proteína de la solución madre de vacuna (unidad: $\mu\text{g/ml}$) y se tomaron como base los resultados para calibrar el contenido de principio activo y preparar las formulaciones y acondicionamientos finales de la vacuna. La evaluación del contenido de proteína de la solución madre de vacuna se realizó de acuerdo con el método descrito en la "Farmacopea de la República Popular China" (2015), Volumen III (Reglas Generales 0731, la "Regla del Camión").

3) Otros ensayos de calidad

Se usaron otros métodos pertinentes para evaluar la calidad de la vacuna. Por ejemplo, también se aplicaron en este caso los procedimientos o métodos de ensayo de producto descritos en la Sección de "vacuna contra la rabia humana liofilizada (células Vero)" de los Principios Generales de la Farmacopea.

4) Resultados

Los resultados se obtuvieron usando los métodos descritos anteriormente para la solución madre de vacuna. Los resultados se compararon con la muestra de virus recogida antes de la purificación para calcular la eficacia de los procesos de purificación para retirar las impurezas. Véase la Tabla 4. Adicionalmente, también se midió la concentración de albúmina sérica bovina (BSA) en la solución madre de vacuna y el resultado mostró una concentración de 6,98 ng/ml. Los resultados muestran que la solución madre de vacuna tenía un contenido bajo de impureza. Por ejemplo, el contenido total de proteína y los residuos de proteína de las células Vero fueron

significativamente más bajos que las normas prescritas por la farmacopea nacional. Véase la Tabla 5.

Tabla 4. Resultados de ensayo para la solución madre de vacuna (virus recogido de células Vero)

Evaluación y análisis		Muestra de virus	Solución madre de vacuna
Cantidad total (ml)		15000	330
ADN de célula hospedadora	Contenido (pg/ml)	$4 \sim 8 \times 10^5$	< 100
Proteína de célula hospedadora	Tasa de retirada (%)		> 99,99
	Contenido (µg/ml)	12,72	3,66
	Tasa de retirada (%)		99,38
Proteína total	Contenido (µg/ml)	2844,71	121,43
	Tasa de retirada		99,91

Tabla 5. Resultados de ensayo de la solución madre de vacuna en comparación con la norma

	Solución madre de vacuna	Norma ¹
Residuo de ADN de la célula hospedadora	< 100 pg/dosis	≤ 100 pg/dosis
Residuo de proteína de célula hospedadora	0,46 µg/dosis	≤ 4µg/dosis
Proteína total	20µg/dosis	≤80 µg/dosis
Pureza del antígeno	> 95 %	Véase la nota al pie ²

¹ Norma de farmacopea nacional

² No se dispone de ninguna norma de pureza cuantitativa. La norma actual recomienda el análisis cualitativo de las impurezas de acuerdo con los resultados de ensayo.

Se analizaron muestras de la solución madre de vacuna tres veces mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Los geles se sometieron a tinción con plata para evaluar la pureza del antígeno vírico. Los resultados se mostraron en la Tabla 6. En la **FIG. 3** se mostró una imagen representativa del análisis por electroforesis SDS-page. Estos resultados muestran que la pureza del antígeno vírico fue superior al 95 % en los tres ensayos individuales. También se analizaron muestras de la solución madre de vacuna mediante microscopía electrónica. Como se muestra en la **FIG. 4**, las partículas de virus tenían una estructura intacta y una morfología típica del virus de la rabia en forma de bala.

Tabla 6. Análisis de la pureza del antígeno vírico en la solución madre de vacuna (virus recogido de células Vero).

N.º de ensayo	Pureza del antígeno (%)
1	95,501
2	95,731
3	95,889
Promedio	95,71

G. Preparación de la formulación de vacuna y acondicionamiento

De acuerdo con los resultados del contenido de proteína total, la solución madre de vacuna se formuló para preparar una solución final que tuviera una concentración de proteína total final de 40 µg/ml. Se añadió el 1 % de albúmina sérica humana y el 5 % de sacarosa como excipiente/estabilizador para estabilizar la formulación de vacuna.

La solución final se acondicionó en tubos de vidrio de 2 ml con un volumen de 0,5 ml por tubo. La vacuna se liofilizó en un liofilizador e inmediatamente se cerró con un tapón de goma y se selló con una tapa de aluminio y plástico.

H. Ensayo de calidad del producto de vacuna

Para evaluar la calidad del producto de vacuna se usaron los procedimientos y métodos de ensayo del producto "vacuna contra la rabia humana liofilizada (células Vero)" descritos en los Principios generales de la "Farmacopea de la República Popular China" en el Volumen III de 2015. Los resultados se compararon con la Norma ilustrada en la versión actual de la Farmacopea Nacional. Véase la Tabla 7. Demostró que cada indicador de calidad del producto cumplió o superó las normas de la farmacopea nacional.

Tabla 7. Evaluación de calidad del producto de vacuna (virus recogido de células Vero)

Ensayo	Norma	Resultado
Identificación (por ejemplo, ELISA)	contiene antígeno vírico	Cumple
Aspecto	Blanco y suelto en forma sólida. Solución transparente después de disolverse. Sin precipitación.	Cumple
Osmolalidad (mOsmol/kg)	Cumple con los criterios	376
pH	7,2~8,0	7,63
Contenido de agua (%)	≤ 3 %	2,43

(continuación)

Ensayo	Norma	Resultado
Potencia (UI/dosis)	$\geq 2,5$	5,4
Estabilidad al calor (UI/dosis)	$\geq 2,5$	3,0
Residuos de proteínas séricas bovinas (ng/dosis)	≤ 50	2,95
Residuo de ADN de células Vero (pg/dosis)	≤ 100	< 100
Residuo de proteína de células Vero (μ g/dosis)	≤ 4	0,46
Esterilidad	Cumple con los criterios	Cumple
Toxicidad poco común	Cumple con los criterios	Cumple
Endotoxina bacteriana (UE/dosis)	≤ 25	< 12,5

I. Evaluación de estabilidad**5 1) Evaluación de estabilidad en tiempo real (estabilidad a largo plazo)**

El producto de vacuna se almacenó a una temperatura de 2-8 °C para un almacenamiento prolongado. Se sometieron a ensayo muestras del producto de vacuna a los 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1 año, 2 años y 3 años después de la colocación para medir la potencia de NIH. Se completó el estudio de estabilidad de 1 año y los resultados del ensayo de potencia de NIH en cada punto temporal se muestran en la Tabla 8. Los resultados mostraron que el producto de vacuna era estable.

Tabla 8. Resultados de ensayo de estabilidad a largo plazo del producto de vacuna

Punto temporal	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Potencia (ensayo de NIH, UI/dosis)	5,9	8,1	6,5	6,7

15 2) Evaluación de la estabilidad térmica

El producto de vacuna se almacenó en una incubadora a 37 °C y se tomaron muestras para someter a ensayo la potencia mediante el ensayo de NIH 28, 35 y 42 días después de su colocación. Los resultados de los ensayos de potencia de NIH en cada punto temporal se muestran en la Tabla 9. Los resultados demostraron que, después de 42 días de tratamiento a 37 °C, el producto de vacuna se mantuvo lo suficientemente estable como para cumplir con la norma de la Farmacopea Nacional. Por lo tanto, la estabilidad térmica del producto a 37 °C supera la estabilidad requerida de 28 días establecida por la Farmacopea Nacional.

J. Homogeneidad entre diferentes lotes

De acuerdo con los mismos procesos y/o métodos descritos en este Ejemplo, se produjeron de forma continua nueve lotes de productos de vacuna vírica. La pureza del antígeno o antígenos víricos se analizó en muestras de cada lote. La Tabla 10 muestra que los diferentes lotes de productos tienen uniformemente una alta pureza (> 95 %) de antígeno vírico, sugiriendo una alta homogeneidad entre los productos.

Tabla 10. Análisis de pureza del antígeno vírico entre nueve lotes producidos de forma continua (recogida de virus de células Vero)

N.º de lote de solución madre de vacuna	Pureza del antígeno (%)
B20150801	96,52
B20150802	96,28
B20150901	96,00
B20151001	95,78
B20151002	95,71
B20151201	95,60
B20151202	96,01
B20160201	95,71
B20160202	95,94

Ejemplo 4: Producción de vacuna contra el virus de la rabia recogida de células diploides humanas (células MRC-5) y evaluación de la calidad del producto**A. Recogida de virus****1) Expansión de células MRC-5:**

Se descongeló un tubo de células MRC-5 criopreservadas en un baño de agua a 38-40 °C. La suspensión celular se

transfirió a un matraz de cultivo celular y se cultivó con medio MEM complementado con suero bovino fetal al 5 % durante 72-96 horas a 37 °C. Después, las células se tripsinizaron y se hicieron pases a nuevos matraces de cultivo celular a una relación de 1:2 durante 6 generaciones. Se prepararon al menos 8 matraces (matraces TC-175) de células MRC.

2) Inoculación de virus

Después de que los fondos del matraz TC-175 se cubrieran con una única capa de células MRC-5, se retiró el medio y se añadió un medio MEM complementado con albúmina sérica humana al 0,3 %. Después, las células se infectaron con la cepa CTN-1 del virus de la rabia a una MOI de 0,01-0,1. Después de que el virus proliferara en la incubadora a 33 °C durante 144 horas, se recogió la primera muestra de virus. Después de eso se añadió medio nuevo y el virus de la rabia proliferó en la incubadora a la misma temperatura durante otras 94 horas. Se recogió la segunda muestra de virus. Por cada matraz TC-175, se recogieron dos muestras de virus. Todas las muestras de virus recogidas de los ocho matraces (o más) se agruparon como un lote de muestra de virus.

B. Evaluación de la muestra de virus

De acuerdo con los métodos utilizados en el Ejemplo 3B, las muestras de virus recogidas de células MRC-5 se evaluaron de manera similar. Los resultados se mostraron en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados de ensayo para la muestra de virus (virus recogido de células MRC-5).

Ensayo	Resultado
Título de virus (DL50 de Ig/ml)	6,52
contenido de antígeno (ELISA) (UE/ml)	0,8
Ensayo de esterilidad	Estéril
Ensayo de micoplasma	Cumple

C. Purificación del virus

El virus se purificó de acuerdo con los procesos y/o métodos descritos en el Ejemplo 3C. El volumen de la columna de DEAE se ajustó proporcionalmente de acuerdo con los resultados de ELISA que indican el contenido de antígeno vírico en la muestra.

D. Inactivación del virus

El virus purificado se inactivó de acuerdo con los procesos y/o métodos descritos en el Ejemplo 3D.

E. Desalinización y preparación de solución madre de vacuna

Después de la purificación e inactivación, la muestra de virus se desalinizó adicionalmente y se preparó una solución madre de vacuna de acuerdo con los procesos y/o métodos descritos en el Ejemplo 3E. La escala de la columna de desalinización se ajustó proporcionalmente de acuerdo con el volumen de muestra después de la inactivación.

F. Evaluación de la solución madre de vacuna

El contenido de proteína y el contenido de antígeno vírico de la solución madre de vacuna se evaluaron de acuerdo los métodos descritos en el Ejemplo 3F. Los resultados se compararon con la muestra de virus antes de la purificación. Véase la Tabla 12.

Tabla 12. Comparación entre la muestra de virus prepurificada y la solución madre de vacuna postpurificada.

Evaluación y análisis		Muestra de virus	Solución madre de vacuna
contenido de antígeno (ELISA)	Cantidad total (ml)	950	3,85
	Contenido (UE/ml)	0,8	36,5
	Tasa de recuperación (%)		18,5 %
Proteína total	Contenido (µg/ml)	3440	152
	Tasa de retirada (%)		99,93 %

Se analizaron muestras de la solución madre de vacuna tres veces mediante electroforesis en gel de poliácridamida-SDS (SDS-PAGE). Los geles se sometieron a tinción con plata para evaluar la pureza del antígeno vírico. Los resultados se mostraron en la Tabla 13. En la **FIG. 5** se mostró una imagen representativa del análisis por electroforesis SDS-page. Estos resultados muestran que la pureza del antígeno vírico fue superior al 95 % en los tres ensayos individuales.

Tabla 13. Análisis de pureza del antígeno vírico (virus recogidos de células diploides humanas)

N.º de ensayo	Pureza del antígeno (%)
1	95,87
2	96,32
3	95,84
Promedio	96,01

G. Preparación de la formulación de vacuna y acondicionamiento

La formulación de vacuna se preparó y acondicionó hasta obtener el producto final como se describe en los métodos y/o procesos descritos en el Ejemplo 3G.

H. Ensayo de calidad del producto final

Puesto que la vacuna contra la rabia recogida de células diploides humanas no se ha enumerado en la Farmacopea Nacional, para evaluar la calidad del producto final de vacuna se usaron los procedimientos y métodos de ensayo del producto "vacuna contra la rabia humana liofilizada (células Vero)" descritos en los Principios generales de la "Farmacopea de la República Popular China" en el Volumen III de 2015. Los resultados se mostraron en la Tabla 13. De acuerdo con las disposiciones pertinentes sobre la gestión de productos de vacuna en este país y en el extranjero, la vacuna que se recogió de células diploides humanas no está sujeta a la evaluación del ADN de la célula hospedadora ni de los residuos proteicos.

Tabla 14. Análisis de calidad del producto de vacuna (virus recogido de células diploides humanas).

Ensayo	Norma	Resultado
Identificación (por ejemplo, ELISA)	Contiene antígeno vírico	En
Aspecto	Blanco y suelto en forma sólida. Solución transparente después de disolverse.	Cumple
	Sin precipitación en solución.	
Osmolalidad (mOsmol/kg)	Cumple con los criterios	381
pH	7,2~8,0	7,67
Contenido de agua (%)	≤ 3 %	2,69
Potencia (UI/dosis)	≥ 2,5	4,6
Estabilidad al calor (UI/dosis)	≥ 2,5	3,6
Residuos de proteínas séricas bovinas (ng/dosis)	≤ 50	3,7
Esterilidad	Cumple con los criterios	En
Toxicidad poco común	Cumple con los criterios	En
Endotoxina bacteriana (UE/dosis)	≤ 25	< 12,5

Ejemplo 5: Producción de vacuna contra el virus de la rabia recogida de embriones de pollo y evaluación de la calidad del producto**A. Recogida de virus**

Se adquirió embrión de pollo de grado SPF de cinco días de edad, esterilizado en la superficie e inoculado con la cepa CTN-1 del virus de la rabia administrando el virus al embrión a través de una aguja en un gabinete de seguridad biológica. El área del embrión donde se aplicó la aguja se selló con una membrana estéril. Después, el embrión se colocó en una incubadora a 33 °C durante 144 horas. Después de la incubación, se recogieron aproximadamente 2 ml de líquido alantoideo de embrión de pollo. Se inocularon cincuenta embriones de pollo con el virus y el líquido alantoideo de embriones de pollo recogido se agrupó como la muestra de virus.

B. Evaluación de la muestra de virus

De acuerdo con los métodos utilizados en el Ejemplo 3B, la muestra de virus recogida de embriones de pollo se evaluó de manera similar. Los resultados se mostraron en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados de ensayo para la muestra de virus (virus recogido de embrión de pollo).

Ensayo	Resultado
Título de virus (DL50 de Ig/ml)	9,02
contenido de antígeno (ELISA) (UE/ml)	28,8
Ensayo de esterilidad	Estéril
Ensayo de micoplasma	Cumple

C. Purificación del virus

1) Pretratamiento de la muestra de virus

Se recogió una muestra de virus de 100 ml de líquido alantoideo de embrión de pollo, recogido y agrupado como se ha descrito anteriormente. A la muestra de virus se le añadieron 400 ml de solución de PBS que contenía albúmina sérica humana al 0,1 %. La solución de PBS tenía un pH de 7,6, fosfato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 150 mM. Después, la muestra de virus se filtró a través de un filtro microporoso de poro de 0,45 µm para retirar los residuos tisulares, células exfoliadas y residuos celulares.

2) Cromatografía en hidroxipatita ("HA")

Después, la muestra de virus filtrada se sometió a una cromatografía en HA en las siguientes condiciones. En primer lugar, se preequilibró una columna CHT con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y NaCl 150 mM. Después se cargaron en la columna aproximadamente veinte volúmenes de columna de la muestra de virus. Después de la carga, se aplicaron a la columna 2-5 volúmenes de columna del tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y NaCl 150 mM para equilibrar la columna. Después, la columna se cargó con un tampón de fosfato 100 mM que tenía un pH de 7,6 y NaCl 150 mM para preeluir la columna. Después de la etapa de preelución, la columna se cargó con un tampón de fosfato 200 mM que tenía un pH de 7,6 y NaCl 150 mM para eluir la columna. El eluato ("el eluato de HA") se recogió de acuerdo con el pico o picos de absorción de luz indicados por el detector de cromatografía.

3) Cromatografía de intercambio aniónico ("IA")

Después, el eluato de HA se sometió a una cromatografía de IA en las siguientes condiciones. En primer lugar, se preequilibró una columna Capto-DEAE con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 150 mM. Después, se cargaron en la columna aproximadamente cinco volúmenes de columna de las muestras filtradas. Después de la carga, se aplicaron a la columna 2-5 volúmenes de columna del tampón de fosfato 20 mM que tiene un pH de 7,6 y contiene NaCl 150 mM para equilibrar la columna. Después, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tiene un pH de 7,6 y contiene NaCl 250 mM para preeluir la columna. Después de la etapa de preelución, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tiene un pH de 7,6 y contiene NaCl 550 mM para eluir la columna. El eluato ("el eluato de IA") se recogió de acuerdo con el pico o picos de absorción de luz indicados por el detector de cromatografía.

D. Inactivación del virus

El virus purificado se inactivó de acuerdo con los procesos y/o métodos descritos en el Ejemplo 3D.

E. Desalinización y preparación de solución madre de vacuna

Después de la purificación e inactivación, la muestra de virus se desalinizó adicionalmente y se preparó una solución madre de vacuna de acuerdo con los procesos y/o métodos descritos en el Ejemplo 3E. La escala de la columna de desalinización se ajustó proporcionalmente de acuerdo con el volumen de muestra después de la inactivación.

F. Evaluación de la solución madre de vacuna

El contenido de proteína y el contenido de antígeno vírico de la solución madre de vacuna se evaluaron de acuerdo los métodos descritos en el Ejemplo 3F. Los resultados se compararon con la muestra de virus antes de la purificación. Véase la Tabla 16.

Tabla 16. Comparación entre la muestra de virus prepurificada y la solución madre de vacuna postpurificada (virus recogido de embrión de pollo).

Evaluación y análisis		Muestra de virus	Solución madre de vacuna
Cantidad total (ml)		500	15,6
Contenido de antígeno (ELISA)	Contenido (UE/ml)	5,76	38,9
	Tasa de recuperación (%)		21,1 %
Proteína total	Contenido (µg/ml)	1320	164
	Tasa de retirada (%)		99,61 %

Se analizaron muestras de la solución madre de vacuna tres veces mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Los geles se sometieron a tinción con plata para evaluar la pureza del antígeno vírico. Los resultados se mostraron en la Tabla 17. En la FIG. 6 se mostró una imagen representativa del análisis por electroforesis SDS-page. Estos resultados muestran que la pureza del antígeno vírico fue superior al 95 % en los tres ensayos individuales.

Tabla 17. Análisis de pureza del antígeno vírico (virus recogido de embrión de pollo).

N.º de ensayo	Pureza del antígeno (%)
1	95,600

(continuación)

N.º de ensayo	Pureza del antígeno (%)
2	95,737
3	95,989
Promedio	95,780

G. Preparación de la formulación de vacuna y acondicionamiento

- 5 La formulación de vacuna se preparó y acondicionó hasta obtener el producto final como se describe en los métodos y/o procesos descritos en el Ejemplo 3G.

H. Ensayo de calidad del producto de vacuna

- 10 Puesto que la vacuna contra la rabia recogida de embriones de pollo no se ha enumerado en la Farmacopea Nacional, para evaluar la calidad del producto de vacuna se usaron los procedimientos y métodos de ensayo del producto "vacuna contra la rabia humana liofilizada (células Vero)" descritos en los Principios generales de la "Farmacopea de la República Popular China" en el Volumen III de 2015. Los resultados se mostraron en la Tabla 18. De acuerdo con las disposiciones pertinentes sobre la gestión de productos de vacuna en este país y en el extranjero, la vacuna que
- 15 se recogió embriones de pollo no está sujeta a la evaluación del ADN de la célula hospedadora ni de los residuos proteicos.

Tabla 18. Análisis de calidad del producto de vacuna (virus recogido de embrión de pollo).

Ensayo	Norma	Resultado
Identificación (por ejemplo, ELISA)	Contiene antígeno vírico	Cumple.
Aspecto	Blanco y suelto en forma sólida. Solución transparente después de disolverse.	Cumple.
Osmolalidad (mOsmol/kg) pH	Sin precipitación en la solución. Cumple con los criterios 7,2~8,0	384 7,66
Contenido de agua (%)	≤ 3 %	2,57
Potencia (UI/dosis)	≥ 2,5	5,1
Estabilidad al calor (UI/dosis)	≥ 2,5	2,7
Residuos de proteínas séricas bovinas (ng/dosis)	≤ 50	< 1
Esterilidad	Cumple con los criterios	Cumple
Toxicidad poco común	Cumple con los criterios	Cumple
Endotoxina bacteriana (UE/dosis)	≤ 25	< 12,5

20 Ejemplo 6: Comparación de vacunas contra la rabia producidas a partir de diferentes métodos

- La muestra de virus se recogió de células Vero y se purificó mediante tres métodos diferentes, dos de los cuales son los métodos tradicionales utilizados generalmente para purificar el virus de la rabia en la técnica: 1) una combinación de ultrafiltración y ultracentrifugación; y 2) una combinación de ultrafiltración y filtración en gel. El tercer método fue
- 25 como se describe en el Ejemplo 1 (que incluye tanto cromatografía de II como cromatografía en HA). De cada método se obtuvo una solución madre de vacuna. Se reconstituyó una muestra de cada solución madre de vacuna en un título de virus de 12,1 UE/ml y se sometió a ensayo el contenido de proteína mediante el ensayo de Lowry, los residuos de proteínas de células hospedadoras mediante ELISA y los residuos de ADN de células hospedadoras mediante tecnología de hibridación (por ejemplo, PCR). Véase la Tabla 19.

30

Tabla 19. Comparación de vacunas contra la rabia producidas a partir de diferentes métodos.

Ensayo	Ultrafiltración y ultracentrifugación	Ultrafiltración y filtración en gel	Método descrito en el Ejemplo 1
Título de antígeno (UE/ml)	12,1	12,1	12,1
Contenido total de proteínas (µg/ml)	125,47	179,82	50,00
Residuos de proteínas de la célula hospedadora (µg/ml)	17,3	24,6	1,5
Residuos de ADN de la célula hospedadora (pg/ml)	> 1000	> 1000	20-100

Ejemplo Comparativo 7: Purificación del virus de la encefalitis japonesa

En este ejemplo, los métodos de aislamiento de virus en la presente divulgación se demuestran aplicando los métodos a muestras biológicas recogidas del cultivo de células Vero en las que las células se infectaron con la cepa P3 del virus de la encefalitis japonesa.

A. Pretratamiento de las muestras biológicas

Las muestras biológicas recogidas se filtraron a través de un filtro de membrana microporosa con un tamaño de poro de 0,45 µm.

B. Cromatografía de intercambio aniónico ("IA")

Después, las muestras filtradas se sometieron a una cromatografía de IA en las siguientes condiciones. En primer lugar, se preequilibró una columna Capto-DEAE con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 8,0. Después, las muestras filtradas se cargaron en la columna. Después de la carga, se aplicaron a la columna 2-5 volúmenes de columna del tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 8,0 para equilibrar la columna. Después, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 8,0 y contenía NaCl 50 mM para preeluir la columna. Después de la etapa de preelución, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,2 y contenía NaCl 300 mM para eluir la columna. El eluato ("el eluato de IA") se recogió de acuerdo con el pico o picos de absorción de luz indicados por el detector de cromatografía.

C. Cromatografía en hidroxiapatita ("HA")

El eluato A recogido de la cromatografía de IA como se ha descrito anteriormente se sometió después a una cromatografía en HA en las siguientes condiciones. En primer lugar, se preequilibró una columna CHT con un tampón de fosfato 5 mM que tenía un pH de 7,2. Después, se cargó en la columna el eluato A. Después de la carga, se aplicaron a la columna 2-5 volúmenes de columna del tampón de fosfato 5 mM que tenía un pH de 7,2 para equilibrar la columna. Después, la columna se cargó con un tampón de fosfato 5 mM que tenía un pH de 7,2 para preeluir la columna. Después de la etapa de preelución, la columna se cargó con un tampón de fosfato 150 mM que tenía un pH de 7,2 y el eluato ("el eluato de HA") se recogió de acuerdo con el pico o los picos de absorción de luz indicados por el detector de cromatografía.

D. Resultados

Las muestras de la solución madre de vacuna obtenida a través del método descrito anteriormente se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) en comparación con las muestras obtenidas a través del método tradicional n.º 1 (filtración en gel) y las muestras obtenidas a través del método tradicional n.º 2 (ultracentrifugación). Los geles se sometieron a tinción con plata para evaluar la pureza del antígeno vírico. En la **FIG. 7** se mostró una imagen representativa del análisis por electroforesis SDS-page. En comparación con el método tradicional n.º 1 (calle n.º 2) y el método n.º 2 (calle n.º 3), el método de la presente invención tiene solo una banda (calle n.º 1), lo que indica que la muestra casi no contenía impurezas y ha logrado excelentes efectos de separación y purificación.

Se usó microscopía electrónica para observar las partículas de virus en la solución madre de vacuna obtenida usando el método descrito en este Ejemplo. La micrografía electrónica en la **FIG. 8** mostró partículas de virus de la encefalitis japonesa con estructura intacta y morfología típica de forma redonda. La morfología de las diferentes partículas víricas no tiene diferencias significativas. Los resultados ilustran además que los métodos de la presente divulgación pueden usarse para aislar y/o purificar partículas de virus intactas altamente homogéneas.

Ejemplo Comparativo 8: Purificación del virus de la gripe

En este ejemplo, los métodos de aislamiento de virus en la presente divulgación se demuestran aplicando los métodos a muestras biológicas recogidas de tejidos de embriones de pollo en las que las células se infectaron con la cepa H1N1 del virus de la gripe.

A. Pretratamiento de las muestras biológicas

Las muestras biológicas recogidas se filtraron a través de un filtro de membrana microporosa con un tamaño de poro de 1,2 µm.

B. Cromatografía de intercambio aniónico ("IA")

Después, las muestras filtradas se sometieron a una cromatografía de IA en las siguientes condiciones. En primer lugar, se preequilibró una columna Capto-DEAE con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6. Después, las muestras filtradas se cargaron en la columna. Después de la carga, se aplicaron a la columna 2-5 volúmenes de

columna del tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 para equilibrar la columna. Después, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 120 mM para preeluir la columna. Después de la etapa de preelución, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 y contenía NaCl 500 mM para eluir la columna. El eluato ("el eluato de IA") se recogió de acuerdo con el pico o picos de absorción de luz indicados por el detector de cromatografía.

C. Cromatografía en hidroxipatita ("HA")

El eluato A recogido de la cromatografía de IA como se ha descrito anteriormente se sometió después a una cromatografía en HA en las siguientes condiciones. En primer lugar, se preequilibró una columna CHT con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6. Después, se cargó en la columna el eluato A. Después de la carga, se aplicaron a la columna 2-5 volúmenes de columna del tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 para equilibrar la columna. Después, la columna se cargó con un tampón de fosfato 20 mM que tenía un pH de 7,6 para preeluir la columna. Después de la etapa de preelución, la columna se cargó con un tampón de fosfato 200 mM que tenía un pH de 7,6 y el eluato ("el eluato de HA") se recogió de acuerdo con el pico o los picos de absorción de luz indicados por el detector de cromatografía.

D. Resultados

Las muestras de la solución madre de vacuna obtenida a través del método descrito anteriormente se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) en comparación con las muestras obtenidas a través del método tradicional n.º 1 (filtración en gel) y las muestras obtenidas a través de el método tradicional n.º 2 (ultracentrifugación). Los geles se sometieron a tinción con plata para evaluar la pureza del antígeno vírico. En la FIG. 9 se mostró una imagen representativa del análisis por electroforesis SDS-page. Los resultados mostraron que las impurezas se redujeron significativamente, mientras que la concentración de proteínas relacionadas con el virus aumentó significativamente.

Se usó microscopía electrónica para observar las partículas de virus en la solución madre de vacuna obtenida usando el método descrito en este Ejemplo. La micrografía electrónica de la FIG. 10 mostró partículas de virus de la gripe con estructura intacta y morfología típica del virus de la gripe. La morfología de las diferentes partículas víricas no tiene diferencias significativas. Los resultados ilustran además que los métodos de la presente divulgación pueden usarse para aislar y/o purificar partículas de virus intactas altamente homogéneas.

El aislamiento y/o la purificación de otros virus con envoltura tales como el virus del sarampión, el virus de la rubeola, la varicela, el virus de las paperas, el virus del dengue o el VIH también pueden lograrse usando los métodos de la presente divulgación sin realizar modificaciones sustanciales a los métodos desvelados en los ejemplos anteriores.

Ejemplo Comparativo 9: Formulación de vacuna

A. Formulación de vacuna y liofilización

La vacuna de virus purificado se formuló en una solución madre de vacuna con albúmina sérica humana en una relación en peso (p/p) del 1,5 %, sacarosa en una relación en peso (p/p) del 5,0 % y un tampón de fosfato que tenía un pH de 7,2-8,0.

La solución madre de vacuna se acondicionó en tubos de vidrio de 2 ml con un volumen de 0,5 ml por tubo y después se liofilizó en un liofilizador.

B. Evaluación del producto de vacuna

1) La pérdida de potencia después de la liofilización

Se midió la potencia de la solución madre de vacuna y del producto de vacuna liofilizado para calcular la tasa de pérdida de potencia durante la liofilización. Véase la Tabla 19. La tasa de pérdida de potencia está dentro del intervalo aceptable.

Tabla 19. Comparación de la potencia entre la solución madre de vacuna y el producto de vacuna liofilizado.

Potencia (UI/ml)		Tasa de pérdida de potencia.
Prelioofilización	Postlioofilización	
13,7	10,8	21,2 %

2) Evaluación del producto de vacuna liofilizado

a) Potencia, contenido de agua y toxicidad poco común

La potencia, el contenido de agua y la toxicidad poco común de la vacuna liofilizada se evaluaron de acuerdo con los siguientes métodos o reglas. La potencia se evaluó de acuerdo con la Regla N.º 3503 de las Reglas Generales del Volumen 3 de la Farmacopea de la República Popular China publicada en 2015. El contenido de agua se evaluó de acuerdo con la Regla N.º 0832 de las Reglas Generales del Volumen 3 de la Farmacopea de la República Popular China publicada en 2015. La toxicidad poco común se evaluó de acuerdo con la Regla N.º 1141 de las Reglas Generales del Volumen 3 de la Farmacopea de la República Popular China publicada en 2015. Véase la Tabla 20.

Tabla 20. Evaluación de la calidad del producto de vacuna liofilizado.

Ensayo	Resultado
Potencia (UI/dosis)	10,8
Contenido de agua	1,8 %
Toxicidad poco común	Cumple

b) Estabilidad térmica

Para someter a ensayo la estabilidad térmica, se incubaron muestras del producto de vacuna a 37 ± 1 °C durante 4, 5 y 6 semanas, respectivamente. Las muestras antes de la incubación y las obtenidas en cada punto temporal después de la incubación se administraron a ratones y la potencia se midió mediante el ensayo de NIH.

Tabla 21. Estabilidad térmica del producto de vacuna liofilizado

Punto temporal	Potencia UI/dosis	Tasa de pérdida de potencia
0	5,4	/
4 semanas	4,1	24,1 %
5 semanas	3,8	29,6 %
6 semanas	3,4	37,0 %

Los resultados muestran que el producto de vacuna liofilizado todavía tenía una potencia superior a 2,5 UI/dosis seis semanas después de incubarlo a 37 °C, lo que cumplía con los requisitos pertinentes del Volumen 3 de la Farmacopea de la República Popular China publicado en 2015.

c) Estabilidad a largo plazo

Para someter a ensayo la estabilidad a largo plazo, la muestra del producto de vacuna se almacenó a 4 ± 2 °C durante 3 meses, 6 meses y 9 meses, respectivamente. Las muestras antes de almacenamiento y las obtenidas en cada punto temporal después del almacenamiento se administraron a ratones y la potencia se midió mediante el ensayo de NIH después de la administración. Véase la Tabla 22.

Tabla 22. Estabilidad a largo plazo del producto de vacuna liofilizado.

Punto temporal	Potencia UI/dosis	Pérdida de potencia
0	5,4	
3 meses	5,2	3,7 %
6 meses	5,0	7,4 %
9 meses	4,8	11,1 %

C. El efecto de la sacarosa sobre la formulación de vacuna liofilizada

Para estudiar el efecto de la sacarosa sobre la formulación de vacuna liofilizada, se sometieron a ensayo diferentes concentraciones de sacarosa, incluyendo el 1 %, 3 %, 5 % y 10 %. La concentración de albúmina sérica humana fue del 1,5 % en todos los ensayos. Se evaluaron el aspecto, el tiempo de redisolución y el contenido de agua de las formulaciones de vacuna producidas. Véase la Tabla 23.

Tabla 23. Formulación de vacuna liofilizada con diferentes concentraciones de sacarosa

Concentración de sacarosa (%)	Aspecto (en forma sólida)	Tiempo de redisolución (segundos)	Contenido de agua (%)
1	Blanco y suelto, poros ligeramente más grandes.	< 10 s	1,5 %
3	Blanco y suelto	< 10 s	1,5 %
5	Blanco y suelto	< 10 s	1,8 %
10	Blanco y suelto	< 20 s	2,4 %

Los resultados mostraron que el aspecto, el tiempo de redisolución y el contenido de agua de las formulaciones de vacuna liofilizadas con sacarosa al 1-10 % cumplieron con los requisitos de la Farmacopea de la República Popular China publicada en 2015. Los resultados también sugirieron que las formulaciones de vacuna liofilizadas con sacarosa al 3-5 % tienen un aspecto y un tiempo de redisolución superiores.

D. El efecto de la albúmina sérica humana sobre la formulación de vacuna

- 5 Para estudiar el efecto de la albúmina sérica humana sobre la formulación de vacuna, se sometieron a ensayo diferentes concentraciones de albúmina sérica humana, incluyendo el 0,3 %, 0,5 %, 1,5 %, 3 % y 5 %. La concentración de sacarosa fue del 5 % en todos los ensayos. Se evaluaron el aspecto, el tiempo de redisolución y el contenido de agua de las formulaciones de vacuna producidas. Véase la Tabla 24.

Tabla 24. Formulaciones de vacuna con diferentes concentraciones de albúmina sérica humana.

Concentración de albúmina sérica humana (%)	Aspecto (en forma sólida)	Tiempo de redisolución (segundos)	Contenido de agua (%)
0,3	Deficiencia de materia sólida, contracción	< 30 s	2,1 %
0,5	Agua y suelto, poros ligeramente más grandes	< 10 s	1,5 %
1,5	Blanco y suelto	< 10 s	1,5 %
3	Blanco y suelto	< 10 s	1,8 %
5	Blanco y suelto	< 10 s	2,4 %

- 10 Los resultados mostraron que las formulaciones de vacuna liofilizadas con albúmina sérica humana al 0,5-5 % tenían aspectos preferibles, mientras que la que tenía albúmina sérica humana al 0,3 % tenía un aspecto menos preferible.

REIVINDICACIONES

1. Un método de purificación de un virus de la rabia a partir de una muestra biológica, que comprende

- 5 a) someter la muestra biológica a una cromatografía de intercambio aniónico ("IA")
 b) seguida de una cromatografía en hidroxiapatita ("HA"),

en donde todas las etapas de cromatografía de IA y en HA tienen lugar a un pH de entre 7,5 y 7,7, preferentemente 7,6,

- 10 y en donde el virus purificado resultante está esencialmente exento de ADN no vírico y tiene menos de aproximadamente el 0,08 % de ADN de la célula hospedadora; y está esencialmente exento de proteínas no víricas y tiene menos de aproximadamente un 3 % de proteínas de las células hospedadoras.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la cromatografía de IA comprende:

- 15 a) una etapa opcional de preequilibrado de IA, que comprende preequilibrar una columna de intercambio aniónico con un tampón de preequilibrado de intercambio aniónico;
 b) una etapa de carga de IA, que comprende cargar la muestra biológica en la columna de intercambio aniónico;
 c) una etapa opcional de equilibrado de IA, que comprende equilibrar la columna de intercambio aniónico con un
 20 tampón de equilibrado de IA;
 d) una etapa opcional de preelución de IA, que comprende preeluir la columna de intercambio aniónico con un tampón de preelución de IA; y
 e) una etapa de elución de IA, que comprende eluir la columna de IA con un tampón de elución de IA.

25 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la cromatografía en HA comprende:

- a) una etapa opcional de preequilibrado de HA, que comprende preequilibrar una columna de HA con un tampón de preequilibrado de HA;
 b) una etapa de carga de HA, que comprende cargar la muestra de cromatografía post-IA en la columna de HA;
 30 c) una etapa opcional de equilibrado de HA, que comprende equilibrar la columna de HA con un tampón de equilibrado de HA;
 d) una etapa opcional de preelución de HA, que comprende preeluir la columna de HA con un tampón de preelución de HA; y
 e) una etapa de elución de HA, que comprende eluir la columna de HA con un tampón de elución de HA.

35 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la cromatografía de IA es cromatografía Capto-DEAE.

40 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el tampón de elución de IA es un tampón de fosfato.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la cromatografía en hidroxiapatita es cromatografía en hidroxiapatita cerámica (CHT).

45 7. El método de la reivindicación 6, en donde el tampón de elución de HA es un tampón de fosfato.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además una etapa de inactivación del virus, opcionalmente en donde la etapa de inactivación del virus se realiza antes de la cromatografía de IA, la cromatografía en HA, o ambas.

50 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la muestra biológica se somete a una etapa de aclarado antes de cargarla en la columna de IA o HA, opcionalmente, en donde la etapa de aclarado comprende microfiltración a través de un microfiltro que tiene un tamaño de poro de 0,1-0,5 µm.

55 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además combinar el virus de la rabia aislado con un estabilizador.

60 11. El método de la reivindicación 10, en donde el estabilizador comprende sacarosa y albúmina, y preferentemente en donde la relación en peso de sacarosa en la mezcla es de aproximadamente el 0,5-10 % y/o la relación en peso de albúmina en la mezcla es de aproximadamente el 1-20 %.

FIG. 1

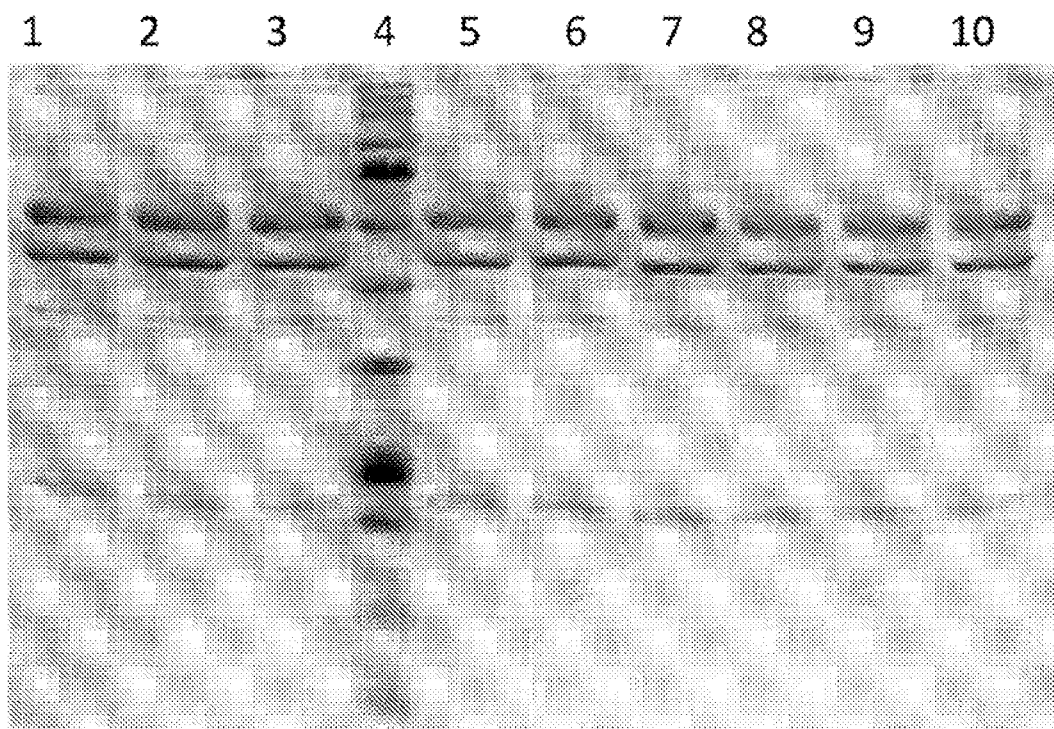


FIG. 2

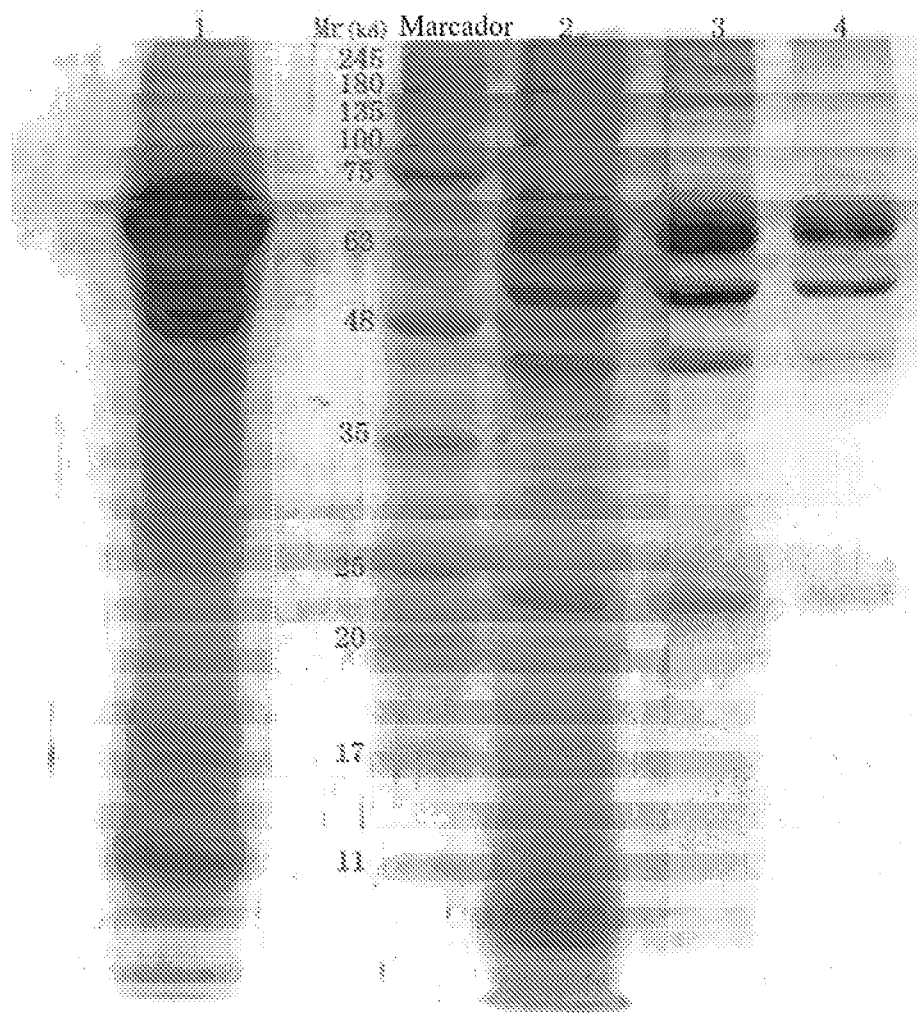


FIG. 3

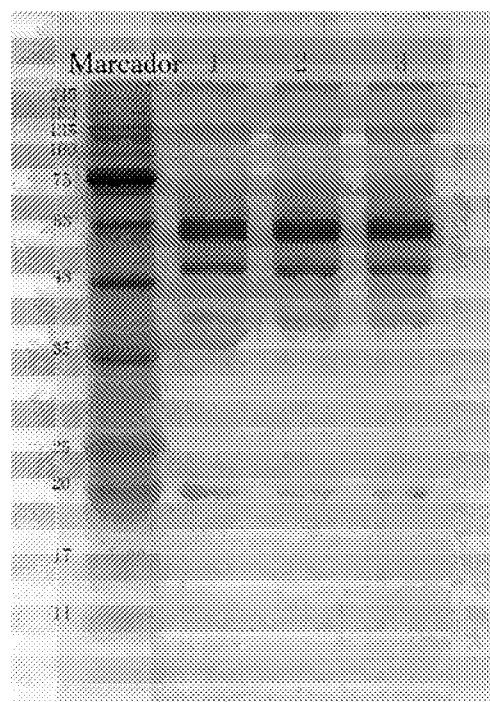


FIG. 4

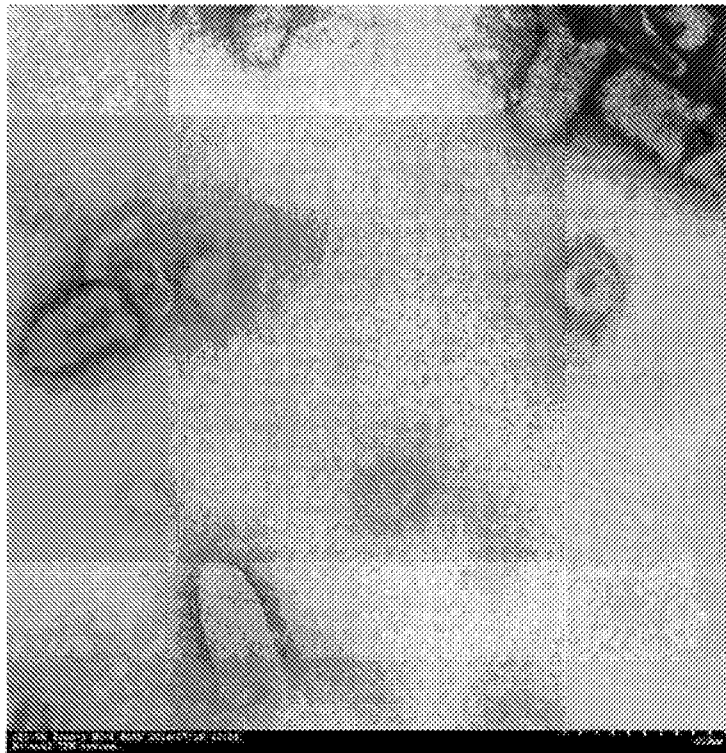


FIG. 5

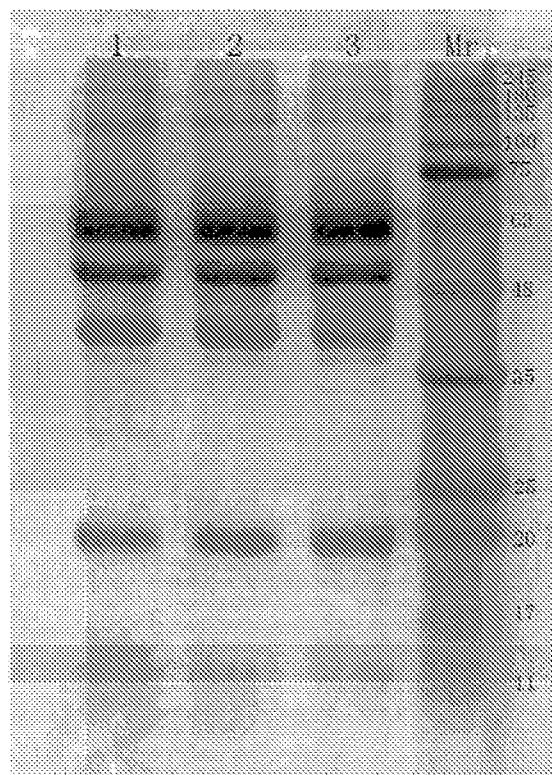


FIG. 6

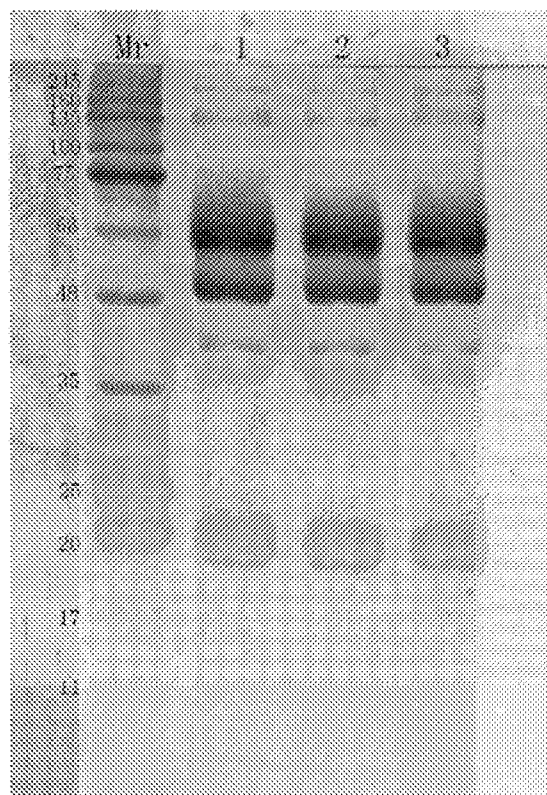


FIG. 7

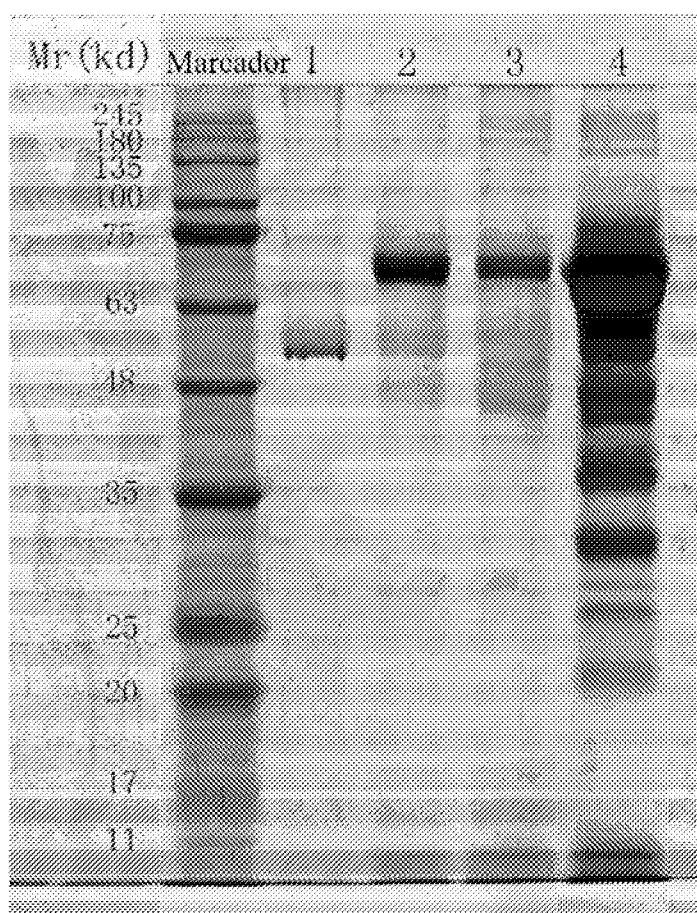


FIG. 8



FIG. 9

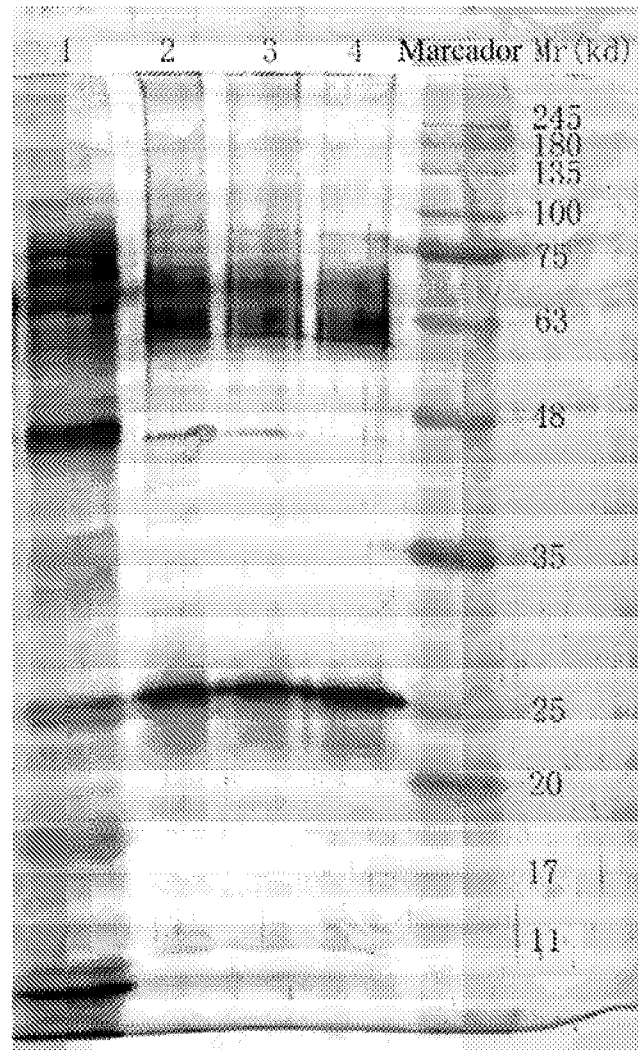


FIG. 10

